

Université Victor Segalen Bordeaux 2

Année 2009

Thèse n°1670

THESE

Pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE BORDEAUX 2

Mention : Sciences Biologiques et Médicales

Option : Biologie-Santé

Présentée et soutenue publiquement

Le 15 décembre 2009

Par **Betty DESCAMPS**

Née le 22 Janvier 1983 à Roncq

ETUDE DES PROPRIETES ANGIOGENIQUES DU SYSTEME
WNT/FRIZZLED

IMPLICATION DU RECEPTEUR FRIZZLED 4 DANS LA
MORPHOGENESE ARTERIELLE

Membres du Jury

Mr Andreas BIKFALVI	Directeur de recherche	Président
Mr Hervé PRATS	Directeur de recherche	Rapporteur
Mr Daniel HENRION	Directeur de recherche	Rapporteur
Mme Mireille MONTCOUQUIOL	Chargée de recherche	Membre
Mr Frédéric JAISSER	Directeur de recherche	Membre
Mme Cécile DUPLAA	Directeur de recherche	Directeur de thèse

THESE

Pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE BORDEAUX 2

Mention : Sciences Biologiques et Médicales

Option : Biologie-Santé

Présentée et soutenue publiquement

Le 15 décembre 2009

Par **Betty DESCAMPS**

Née le 22 Janvier 1983 à Roncq

ETUDE DES PROPRIETES ANGIOGENIQUES DU SYSTEME
WNT/FRIZZLED

IMPLICATION DU RECEPTEUR FRIZZLED 4 DANS LA
MORPHOGENESE ARTERIELLE

Membres du Jury

Mr Andreas BIKFALVI	Directeur de recherche	Président
Mr Hervé PRATS	Directeur de recherche	Rapporteur
Mr Daniel HENRION	Directeur de recherche	Rapporteur
Mme Mireille MONTCOUQUIOL	Chargée de recherche	Membre
Mr Frédéric JAISSER	Directeur de recherche	Membre
Mme Cécile DUPLAA	Directeur de recherche	Directeur de thèse

*A tous les membres du jury,
Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail*

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	3
ABBREVIATIONS.....	9
AVANT PROPOS.....	13
INTRODUCTION.....	16
Chapitre I : Le système Wnt/Frizzled	17
I. Wnt, Frizzled et Dishevelled.....	17
A. Mise en place.....	17
B. Les ligands Wnt.....	19
1. Gènes	19
2. Structure des protéines	24
3. Fonctions	24
C. Les récepteurs Frizzled.....	25
1. Gènes	25
2. Structure des protéines	29
3. Localisation	30
4. Mécanisme d'activation	30
D. Lipoprotein Receptor-related Proteins 5/6 (LRP5/6).....	31
E. Dishevelled: Plaque tournante du système Wnt/Fzd.....	32
1. Structure de Dishevelled	32
2. Localisation de Dishevelled	34
3. Implication de Dvl dans les voies de signalisation	35
II. La voie canonique Wnt/Fzd	36
A. Le complexe de dégradation APC-Axine-GSK3 β	38
1. Adenomatous Polyposis Coli (APC).....	38
2. Axine	38
3. Glycogen Synthase Kinase 3 β (GSK3 β).....	39
B. La protéine centrale de la voie canonique : la β -caténine	41
1. Structure et localisation	41
2. Régulation dans la voie Wnt canonique.....	41
3. Régulation transcriptionnelle : rôle des facteurs LEF/TCF	42
III. Les voies dites non canoniques Wnt/Frizzled	43
A. La voie de polarité planaire cellulaire (PCP)	44
1. L'activation des petites GTPases Rho et Rac dans la voie PCP	45
2. Mécanismes d'activation de Dvl dans la voie PCP	46
a) Les multiples éléments de la voie PCP	46
b) Mécanismes moléculaires et cellulaires de la voie PCP	48
c) Localisation subcellulaire des éléments de la voie PCP	48
B. La voie non canonique Wnt/Ca ²⁺	50
IV. Modulateurs extracellulaires	51
A. Antagonistes de Wnt	52

1.	Secreted Frizzled Related Proteins (sFRP)	52
a)	Structure et fonction des sFRP	52
b)	Mécanisme de régulation du système Wnt/Fzd.....	54
2.	Wnt inhibitory protein, Dickkopf et WISE/SOST	54
B.	Agonistes de Wnt	55
V.	Implication de Frizzled 4 et Dishevelled 3 dans l'activation des voies de signalisation .	55
A.	Frizzled4.....	55
B.	Dishevelled3.....	56
C.	Données connues sur le partenariat entre Frizzled4 et Dishevelled3	57
Chapitre II	Morphogenèse de l'arbre vasculaire.....	58
I.	Présentation générale.....	58
II.	Organisation générale du système vasculaire.....	59
A.	Les vaisseaux de gros calibre	59
B.	Les vaisseaux de moyen et petit calibre	61
C.	Mécanismes cellulaires de la morphogenèse vasculaire	63
1.	La vasculogenèse.....	63
2.	L'angiogenèse	64
a)	Vasodilatation, perméabilité vasculaire et dégradation de la MEC	64
b)	Prolifération et migration des CE.....	65
c)	Structuration des vaisseaux	66
(1)	Régulation des cellules apicales ou « tip cells ».....	67
(2)	Régulation des « stalk cells »	68
d)	Formation des tubes endothéliaux.....	68
e)	Différenciation artério-veineuse.....	69
f)	Remodelage vasculaire.....	70
3.	L'artériogenèse.....	71
III.	Facteurs impliqués dans le développement vasculaire.....	72
A.	Basic Fibroblast Growth factor ou bFGF	73
1.	Le système ligand /récepteur du bFGF	73
2.	Voies de signalisation activées par le bFGF	74
3.	Rôle du bFGF dans le développement vasculaire	75
4.	La signalisation bFGF et le système Wnt/Fzd	77
B.	Transforming Growth Factor- β ou TGF- β	79
1.	Voies de signalisation du TGF- β dépendantes des Smad	79
2.	Voies de signalisation du TGF- β indépendantes des Smad.....	81
3.	Rôle de la signalisation TGF- β dans le développement vasculaire.....	82
4.	La signalisation TGF- β et le système Wnt/Fzd.....	86
C.	Implication du système Wnt/Fzd au niveau vasculaire	88
1.	Analyse génétique du système Wnt/Frizzled dans le développement du réseau vasculaire.....	88
2.	Expression des partenaires du système Wnt/Fzd et activité dans les cellules vasculaires	90
3.	Les gènes cibles de Wnt codant pour des régulateurs angiogéniques.....	93

PRESENTATION DES RESULTATS	94
Partie I : Etude des cellules souches mésenchymateuses dans l'angiogenèse via le système Wnt/Fzd.....	95
I. Implication de sFRP1 dans la régulation des propriétés des MSC durant l'angiogenèse	97
II. Effet du préconditionnement des MSC en hypoxie 1% d'O ₂ sur la régénération vasculaire.....	99
III. Conclusion et discussion	102
Partie II : Implication du récepteur Frizzled 4 dans la régulation de la morphogenèse vasculaire et participation de la protéine centrale Dishevelled	105
I. Implication de Frizzled4 dans la régulation des propriétés des cellules vasculaires	107
II. Implication de Fzd4 dans la formation des vaisseaux.....	109
A. Matériels et méthodes.....	109
1. Analyses <i>in vivo</i>	109
a) Géotypage des souris WT et KO.....	109
b) Analyse immunohistochimique.....	109
(1) Marquage Xgal sur tissus	109
(2) Marquage des érythrocytes	110
(3) Marquage sur coupes <i>in toto</i>	110
c) Analyse du réseau artériel par microscanner.....	111
(1) Préparation du produit de contraste et injection de l'animal	112
(2) Acquisition et analyse des images	112
d) Analyse des paramètres cardiaques, rénaux et vasculaires	113
e) Analyse génomique par MicroArray.....	114
2. Analyses <i>in vitro</i>	115
a) Culture cellulaire	115
(1) Isolement de cellules primaires	115
(a) Isolement de cellules endothéliales primaires à partir de reins de souris .	115
(b) Isolement de cellules musculaires lisses primaires à partir d'aortes de souris	115
(c) Isolement de MEF (Murine Embryonic Fibroblasts).....	116
(2) Mise en culture des cellules.....	116
(3) Transfection des cellules	117
(4) Traitement des cellules	119
b) Tests fonctionnels.....	119
(1) Prolifération cellulaire	119
(a) Comptage cellulaire	119
(b) Incorporation du BrdU dans les cellules.....	119
(c) Etude du cycle cellulaire par cytométrie de flux.....	120
(2) Migration cellulaire	120
(a) Migration par chimiotactisme	120
(b) Migration sur strie (Wound healing).....	121
(c) Migration non directionnelle par vidéo microscopie	121
(d) Polarisation du Golgi	121

(e)	Différenciation des cellules endothéliales en tubes endothéliaux.....	122
c)	Détection des protéines	123
(1)	Western Blot	123
(2)	Immunofluorescence	125
(3)	Activité luciférase.....	127
d)	Détection des ARN messagers	129
(1)	Extraction des ARN totaux et dosage.....	129
(2)	Transcription inverse	129
(3)	PCR quantitative.....	129
3.	Mise au point des outils.....	131
a)	Caractérisation des cellules primaires	131
(1)	Cellules endothéliales rénales primaires.....	131
(2)	Cellules musculaires lisses aortiques primaires.....	131
b)	Validation par qPCR de l'inhibition du gène <i>fzd4</i> par ARN interférence dans les HMEC-1 et les MEF	132
4.	Double hybride.....	133
a)	Principe du double hybride	133
b)	Procédure expérimentale	134
(1)	Clonage de la construction Dvl3ΔDIX dans le vecteur appât pGBKT7	134
(2)	Double hybride	136
(3)	Extraction des clones obtenus.....	138
B.	Résultats	139
1.	Analyse <i>in vivo</i> de l'implication de Fzd4 dans la régulation de la morphogenèse vasculaire.....	139
a)	Profil d'expression vasculaire de Fzd4	139
b)	Effet de la délétion de <i>fzd4</i> sur le réseau artériel.....	141
c)	Effet de la délétion de <i>fzd4</i> sur la densité vasculaire et l'organisation des vaisseaux	145
d)	Effet de la délétion de <i>fzd4</i> sur les fonctions cardiaque et rénale.....	147
(1)	Effet de la délétion de <i>fzd4</i> sur la fonction cardiaque	147
(2)	Effet de la délétion de <i>fzd4</i> sur la fonction rénale.....	148
e)	Effet de la délétion de <i>fzd4</i> sur les paramètres vasculaires	149
(1)	Analyse des propriétés mécaniques d'une grosse artère, la carotide.....	149
(2)	Analyse de la réactivité artérielle de petites artères	150
2.	Analyse <i>in vitro</i> du rôle de Fzd4 sur les propriétés fonctionnelles des cellules vasculaires	153
a)	Rôle de Fzd4 sur la prolifération des cellules vasculaires	154
b)	Rôle de Fzd4 sur la migration et la polarisation des cellules vasculaires	156
(1)	Effet de la délétion de <i>fzd4</i> sur la migration des cellules vasculaires	156
(2)	Effet de la délétion de <i>fzd4</i> sur la polarisation des cellules vasculaires.....	158
c)	Rôle de Fzd4 sur la différenciation des cellules endothéliales.....	161
3.	Mécanismes moléculaires régulés par Fzd4.....	162
a)	Analyse de la modulation des gènes induite par la délétion de <i>fzd4</i>	162
(1)	Analyse génomique par MicroArray	162
(2)	Analyse transcriptionnelle par PCR quantitative.....	166
b)	Implication de Fzd4 dans la régulation d'autres voies de signalisation.....	168
(1)	Implication de Fzd4 dans la régulation du cycle cellulaire via le facteur de transcription E2F1	168
(2)	Implication de Fzd4 dans la régulation de la signalisation TGF-β.....	169

(3) Implication de Fzd4 dans la régulation de la signalisation bFGF	171
C. Conclusion, discussion et perspectives	173
III. Résultats préliminaires sur l'étude du partenaire intracellulaire de Fzd4, la protéine centrale Dishevelled3	182
A. Résultats préliminaires sur l'analyse du partenariat entre Fzd4 et les isoformes de Dvl 182	
1. Localisation de Dvl1, Dvl2 et Dvl3	182
a) Localisation des 3 isoformes de Dvl sous Fzd4	182
b) Localisation des 3 isoformes de Dvl sous Fzd7	187
2. Analyse du partenariat Fzd4-Dvl dans l'activation de la voie canonique.....	188
a) Activation de la voie canonique sous Fzd4 et Dvl1/3	188
a) Activation de la voie canonique sous Fzd7 et Dvl3	191
3. Analyse de l'implication du domaine DIX de Dvl3 dans son interaction avec Fzd4 192	
B. Perspective de recherche des partenaires intracellulaires de Dvl3.....	193
C. Conclusions et perspectives	194
1. Partenariat entre Fzd4 et les isoformes 1 et 3 de Dvl.....	194
2. Recherche de partenaires intracellulaires de Dvl3	196
CONCLUSION GENERALE	200
ANNEXE	203
E2F1 dans le cycle cellulaire.....	204
I. Les rôles opposés de E2F1	204
A. Activateur du cycle cellulaire.....	205
B. Répresseur du cycle cellulaire.....	205
II. E2F1 et le système Wnt/ β -caténine.....	206
BIBLIOGRAPHIE	208
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	236
I. COMMUNICATIONS.....	237
II. PUBLICATIONS	239

ABBREVIATIONS

aa : acides aminés
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
AKT/PKB : Proteine Kinase B
ALK : Activin receptor-Like Kinase
 α -SMA: Alpha-Smooth Muscle Actin
Ang-1/2 : angiopoïétine-1/2
APC : Adenomatous Polyposis Coli
ARN : Acide RiboNucléique
BET : Bromure d'Ethidium
bFGF : basic Fibroblast Growth Factor
BMP : Bone Morphogenic Proteins
BrdU : BromoDésoxyUridine
BSA : Bovine Serum Albumine
CAM : membrane chorio-allantoïde du poulet
CD31 : Cluster of Differentiation 31
CE : Cellules Endothéliale
CK1 : Casein kinase 1
CML : Cellule Musculaire Lisse
CRD : Cystein rich Domain
DAAM: Dishevelled-associated activator of morphogenesis
DAB : Diaminobenzidine
DAG : Diacylglycérol
DEP: Dishevelled, EGL-10, Pleckstrin
Dgo: Diego
DIX: Dishevelled/Axin
Dkk : Dickkopf
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DO : Densité Optique
dpc : days post-coitum
Dsh /Dvl : Dishevelled
EPC : Endothelial Precursor Cells
ERK : Extracellular signal-Regulated Kinase
FEVR: Vitréorétinopathie exsudative familiale
FGF : Fibroblast Growth Factor
FGFR : Fibroblast Growth Factor Receptor
FITC : Fluorescein IsoThioCyanate
Fmi: Flamingo
FRS1/2: Substrat $\frac{1}{2}$ du FGFR
Fzd: Frizzled
GBP/Frat : GSK3 β Binding Protein
GSK3 β : Glycogen Synthase Kinase 3 beta

HIF : hypoxia-inducible factor
HMEC-1: Human Microvascular Endothelial Cell
HS: Horse Serum
HSC: Hematopoietic stem cell
HUVEC : Human Umbilical Vein Endothelial Cell
JNK : Jun NH2-terminal Kinase
KDa : KiloDalton
KO : Knock-Out
LB : Luria Bertani
LEF : Lymphoid Enhancer-binding Factor
LRP 5/6 : Lipoprotein Receptor-related Proteins 5/6
MAPK : Mitogen Activated Protein Kinases
MCP1: Monocyte chemotactic protein-1
MEC : Matrice ExtraCellulaire
MEF : Murin embryonic fibroblast
MMP : Matrix Metalloproteinase
MMTV : Mouse Mammary Tumor Virus
MSC: Mesenchymal stem cell
NO : Monoxyde d'azote
NRP1 : neuropiline 1
NTR : Netrin like domaine
PBS : Phosphate Buffer Saline
PCP : Planar Cell Polarity
PCR : Polymerase Chain Reaction
PDGF : Platelet-Derived Growth Factor
PDGFR : Platelet-Derived Growth Factor Receptor
PDZ: PSD-95, DLG, ZO1
PECAM-1 : platelet endothelial cell adhesion molecule-1
PI : iodure de Propidium
PI-3K : PhosphoInositol-3 Kinase
PIP3 : phosphatidylinositol-3, 4, 5-triphosphate
Pk: Prickel
Rspo : Rspodin
RT-PCR : Retro Transcription Polymerase Chain Reaction
S-1-P : sphingosine-1-phosphate
SDS : Sodium Dodécyl Sulfate
sFRP : secreted Frizzled Related Proteins
Shh: Sonic Hedgehog
siRNA : short interfering RNA
smMHC: smooth muscle Myosin Heavy Chain
Stbm : Strabismus
SVF : Sérum de Veau Foetal

TCF : T-cell Factor

TGF- β : transforming growth Factor β

TNF α : Tumor Necrosis Factor alpha

Vang: Van Gogh

VE-cadhérine : Vascular Endothelial-cadhérine

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

VEGFR-1 : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 : Flt-1

VEGFR-2 : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 : KDR : Flk-1

WIF : Wnt Inhibitory Factor

AVANT PROPOS

L'obstruction des vaisseaux est responsable d'ischémie tissulaire dans différents territoires périphériques, cardiaques et cérébraux. Les maladies cardiovasculaires demeurent la première cause de mortalité en France ; environ 170 000 décès sont recensés chaque année. Parmi les plus fréquentes, les cardiopathies ischémiques sont responsables de 27% des décès, les accidents vasculaires cérébraux de 25 % et les insuffisances cardiaques de 23 %. Les mécanismes d'adaptation à l'ischémie requièrent une adaptation vasculaire au niveau du tissu ischémique, avec le développement de nouveaux vaisseaux sanguins afin de corriger le défaut de perfusion tissulaire. C'est pourquoi mieux comprendre les mécanismes favorisant la formation et le maintien de néo-vasseaux fonctionnels dans un tissu ischémique est un pré-requis pour améliorer le traitement des pathologies ischémiques. Ma recherche s'inscrit dans l'étude des mécanismes de formation et d'organisation des vaisseaux sanguins en condition physiologique et pathologique chez l'adulte.

Le développement du système vasculaire est un processus biologique complexe. La vasculogenèse, l'angiogenèse et l'artériogenèse sont des processus hautement régulés qui permettent le développement et le maintien du système circulatoire mature et fonctionnel. Récemment, les protéines Wnt et leurs récepteurs Frizzled ont émergé en tant que système régulant la formation des vaisseaux sanguins via une signalisation intracellulaire complexe. Ce système Wnt/Frizzled met en jeu deux signalisations, canonique et non canonique, contrôlant divers processus biologiques et cellulaires. Mes travaux ont donc porté sur l'étude de l'implication du système Wnt/Frizzled dans la formation des vaisseaux sanguins.

L'introduction de ce manuscrit comporte deux chapitres. J'ai tout d'abord décrit la voie Wnt/Frizzled, en développant les différents acteurs de ce système et les différentes voies de signalisation activées, à savoir la voie canonique et les voies non canoniques. J'ai également détaillé les données concernant le récepteur Frizzled4 et la protéine Dishevelled3, deux acteurs du système Wnt qui ont été plus particulièrement étudiés. J'ai ensuite choisi de décrire le développement de l'appareil vasculaire, et plus particulièrement l'angiogenèse et le développement des branchements du réseau artériel, afin de mettre en évidence les mécanismes connus dans ces processus. Les signalisations de certains facteurs de croissance nécessaires à l'angiogenèse, à savoir le basic Fibroblast Growth Factor ou bFGF et le Transforming Growth Factor ou TGF- β ont été développées plus en détail. Enfin, les données démontrant l'implication du système Wnt/Frizzled dans le développement des vaisseaux ont été décrites.

Dans le cadre de l'analyse des mécanismes de formation des vaisseaux sanguins en condition pathologique, j'ai tout d'abord participé à l'étude de l'implication du système Wnt/Frizzled dans la régulation des propriétés angiogéniques des cellules souches mésenchymateuses (MSC). En effet, les MSC apparaissent comme des cellules capables de réparer les dommages ischémiques chez les patients. Plusieurs travaux ont suggéré l'importance de la signalisation Wnt dans la contribution des MSC à régénérer les tissus ischémiques. Une 1^{ère} étude a porté sur l'implication de sFRP1, un Frizzled circulant, modulateur de la voie Wnt/Frizzled qui joue un rôle sur la formation des vaisseaux sanguins (Ezan et al. 2004), dans la régulation des propriétés des MSC durant l'angiogenèse.

J'ai également participé à une 2^{ème} étude portant sur l'effet d'un préconditionnement hypoxique sur le potentiel angiogénique des MSC et sur la modulation de la signalisation Wnt dans ces cellules. En effet, le potentiel angiogénique des MSC a été étudié dans des modèles murins où l'environnement du tissu évolue d'une hypoxie sévère vers une progressive réoxygénation. Ce changement environnemental constituerait un signal induisant l'activation et la mobilisation des MSC pour la formation des néo-vaisseaux.

J'ai ensuite travaillé sur un des récepteurs du système Wnt/Frizzled, le récepteur Frizzled4. Ce récepteur a été impliqué dans le développement vasculaire au niveau de la rétine (Xu et al. 2004), et est associé à une maladie héréditaire, la vitréorétinopathie exsudative familiale (Robitaille et al. 2002). Cependant, son rôle dans la formation des vaisseaux d'autres territoires vasculaires et les mécanismes mis en jeu sont encore peu clairs. C'est pourquoi l'objectif principal de ma thèse a été d'étudier l'implication du récepteur Frizzled4 dans la régulation de la morphogénèse vasculaire. Pour cela, j'ai réalisé un phénotypage vasculaire de souris transgéniques délétées pour le gène *frizzled4* obtenues de l'équipe de Nathans (Baltimore, USA). A partir de ces souris, j'ai également isolé des cellules vasculaires primaires afin d'étudier le rôle de Frizzled4 sur les propriétés de ces cellules. J'ai aussi abordé l'analyse des mécanismes moléculaires mis en jeu par Frizzled4 en étudiant la participation d'une protéine centrale à ce système, la protéine Dishevelled, dont les résultats préliminaires seront présentés.

INTRODUCTION

Chapitre I : Le système Wnt/Frizzled

Les différentes voies de la signalisation Wnt/Frizzled vont être décrites dans ce chapitre, afin de comprendre les mécanismes moléculaires qui régissent ces voies. De plus, les données connues sur les partenaires Frizzled4 et Dishevelled3 seront plus détaillées dans la mesure où ils ont fait le principal sujet de ma thèse.

I. Wnt, Frizzled et Dishevelled

A. Mise en place

La signalisation Wnt/Frizzled (Wnt/Fzd) met en jeu des glycoprotéines sécrétées Wnt qui agissent en tant que ligands pour activer des voies de signalisation, et ce, par le biais de récepteurs Frizzled (Fzd). Depuis plusieurs années, les fonctions de ce système ont été l'objet d'intenses investigations. Ce système contrôle divers processus biologiques et cellulaires, s'étendant de l'adhésion cellulaire (Lilien et al. 2005), du renouvellement des cellules souches et du développement de cancers (Reya et al. 2005) à la différenciation cellulaire, à la polarité, migration, prolifération cellulaire et au développement tissulaire (Eisenberg et al. 2006; Peifer et al. 2000). La signalisation Wnt est aussi impliquée dans de nombreuses maladies humaines telles que le cancer, l'ostéoporose et les maladies cardiovasculaires.

Les connaissances au sujet du système Wnt/Fzd proviennent d'études génétiques effectuées sur différents modèles (drosophile, souris, poisson-zèbre, nématode), d'études biochimiques ou de biologie cellulaire réalisées sur le xénope, l'oursin, les embryons de poulet ou les cultures de cellules de mammifères. Les résultats recueillis au cours de ces années ont été assemblés sur un site élaboré et fréquemment mis à jour par l'équipe de Roel Nusse à l'université de Stanford : « The Wnt Homepage »

(<http://www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html>).

Le système Wnt/Fzd active plusieurs voies de signalisation (Huelsken et al. 2001) (**Figure 1**), mettant en jeu 19 membres dans la famille Wnt et 10 membres dans la famille Fzd. Certains Wnt sont supposés activer la voie de signalisation Wnt canonique, tandis que d'autres sont supposés activer les voies de signalisation non-canoniques. Plusieurs membres du système Wnt/Fzd possèdent un profil d'expression spatio-temporel et pourraient interagir de façon spécifique, permettant une régulation fine de la réponse initiée par l'activation du système.

Nous allons décrire dans une première partie les principaux acteurs de la voie Wnt/Fzd, molécules de signalisation hautement conservées.

Ensuite, nous détaillerons la voie de signalisation canonique, dépendante des fonctions nucléaires de la β -caténine. Dans cette voie, la β -caténine joue le rôle de facteur de transcription et régule la transcription de gènes qui ont un rôle dans la prolifération, la survie ou encore la détermination cellulaire.

Dans la partie suivante, nous aborderons les voies de signalisations indépendantes de la β -caténine, dites non canoniques: la voie de polarité planaire (PCP) et la voie calcium dépendante, qui sont plutôt impliquées dans la polarité, la migration et la différenciation cellulaire.

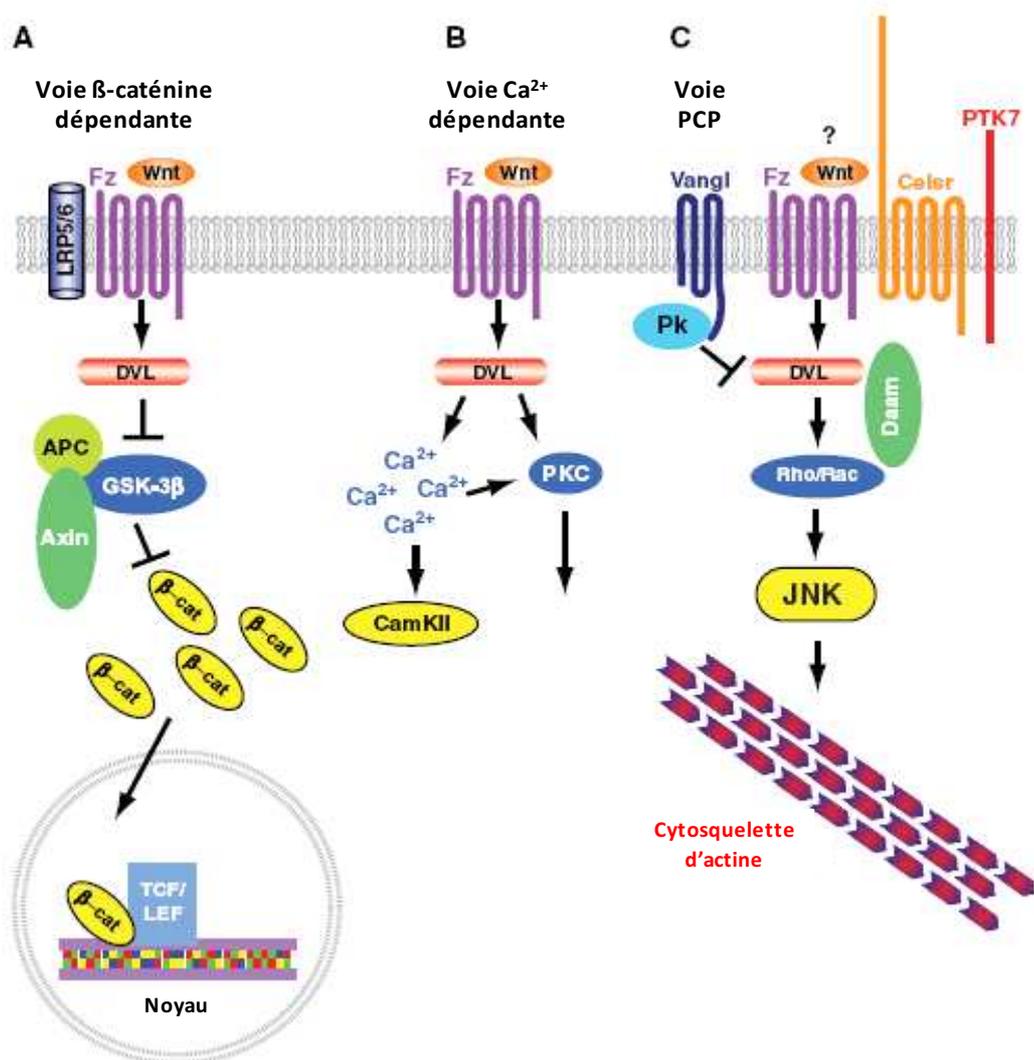


Figure 1: Illustration des voies de signalisation Wnt/Frizzled

La liaison d'un Wnt à un récepteur Fzd peut activer 3 voies: la voie canonique β -caténine (A), la voie de polarité planaire cellulaire PCP (C) ou la voie dépendante du calcium (B). D'après (Montcouquiol et al. 2006)

B. Les ligands Wnt

1. Gènes

Les membres de la famille Wnt sont des glycoprotéines sécrétées, très conservés, qui ont été identifiés aussi bien chez les vertébrés que chez les invertébrés. Chez l'homme, il existe 19 gènes Wnt, et certains sont organisés en clusters et sont issus de duplications ancestrales (Miller 2002).

La perte de fonction de certains gènes Wnt souligne le rôle essentiel de ces membres dans plusieurs événements embryonnaires tels que la spécification des axes, la différenciation et la prolifération au sein des tissus et des organes. Les données recueillies au cours de ces années pour différentes espèces sont répertoriées dans le **tableau 1**.

Gène	Homo Sapiens	Mus musculus	Xenopus	Gallus gallus	Danio rerio	Drosophila melanogaster
<i>Wnt1</i>	WNT1	<p>Wnt1</p> <ul style="list-style-type: none"> - Défauts de développement cérébral - Anomalies de la crête neurale double KO <i>Wnt1/3a</i> - Diminution du nombre de thymocytes avec Wnt4 	Wnt-1 OUI	Wnt-1	<p>wnt1</p> <ul style="list-style-type: none"> - Défauts de développement cérébral 	<p>wingless</p> <ul style="list-style-type: none"> - Défauts de polarité segmentaire
<i>Wnt2</i>	WNT2	<p>Wnt2</p> <ul style="list-style-type: none"> - Défauts de placentation (vascularisation) 	Wnt-2A OUI	-	wnt2	<p>DWnt2</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pigmentation des gonades - Muscle adulte - Trachée
<i>Wnt2B</i>	WNT2B/13	<p>Wnt2b/13</p> <ul style="list-style-type: none"> - Surexpression inhibe la différenciation des cellules de la rétine 	Wnt-2B	-	<p>wnt2b</p> <ul style="list-style-type: none"> - Défauts dans spécification du foie 	-
<i>Wnt3</i>	WNT3 - Tetraamelia	<p>Wnt3</p> <ul style="list-style-type: none"> - Défauts de gastrulation - Défauts de formation des poils et des membres - Régule neurogenèse de l'hippocampe 	Wnt-3	-	wnt3	<p>DWnt3/5</p> <ul style="list-style-type: none"> - Guidance axonale
<i>Wnt3A</i>	WNT3A	<p>Wnt3a</p> <ul style="list-style-type: none"> - Somitogenèse perturbée ; Anomalies des crêtes neurales ; Perte de l'hippocampe - Détermination de l'axe A/P - Défauts dans autorenouvellement des HSC 	Wnt3A OUI	Wnt-3A - Défauts de polarité des membres	-	-
<i>Wnt4</i>	WNT4	<p>Wnt4</p>	Wnt4	Wnt-4	wnt4a	DWnt4

Wnt4B	- Virilisation et régression des ductes de Müller WNT4B	- Défauts formation des reins - Défauts formation tractus reproducteur femelle - Diminution nombre de thymocytes - Répression migration des précurseurs adrénaux et CE dans gonades - Anomalie de guidance axonale WNT4B	NON	-	wnt4b	- Mouvements cellulaires des ovaires - Spécificité dorso-ventrale
Wnt5A	WNT5A	Wnt5a - Croissance des membres et de l'axe A/P - Défauts de morphogenèse pulmonaire - Prolifération et différenciation des chondrocytes - Inhibe la prolifération des cellules B, supresseur de tumeurs - Défauts formation tractus reproducteur femelle - Cochlée raccourcie et élargie (polarité planaire) - Développement des glandes mammaires	Wnt-5A NON - (OUI avec HFz5 ou Fzd4)	Wnt-5A - Rôle chondrogénèse des membres	-	-
Wnt5B	WNT5B - Associé au diabète de type2	Wnt5b	Wnt-5B	-	wnt5b - Défauts de formation de la queue - Fonction dans régénération	-
Wnt6	WNT6	Wnt6	Wnt-6 - Inducteur des crêtes neurales	Wnt-6 - Inducteur des crêtes neurales		DWnt6

Wnt7A	WNT7A - Syndrome de Fuhrmann	Wnt7a - Défauts de polarité au niveau des membres - Défauts formation tractus reproducteur femelle - Défauts maturation des synapses au niveau du cervelet - Favorise la différenciation neuronale - Vascularisation système nerveux central	Wnt-7A	Wnt-7A - Polarité dorso-ventrale - Formation du plumage	wnt7	-
Wnt7B	WNT7B	Wnt7B - Défauts développement placentaire - Défauts vascularisation pulmonaire - Mort cellulaire programmée induit par macrophage - Développement de poumon - Axe cortico-médullaire du rein	Wnt-7B OUI	Wnt-7B	wnt7A	-
Wnt7C	WNT7C		-	-		-
Wnt8A	WNT8A	Wnt8a	Wnt-8A OUI	-	wnt8A - Gastrulation (mésoderme et neuro-ectoderme)	WntD/DWnt8 - Antagoniste dorsal - Immunité
Wnt8B	WNT8B	Wnt8b	Wnt-8B OUI	Wnt-8B	wnt8b	-
Wnt9A	WNT9A	Wnt9a - Intégrité durant chondrogenèse (Mutant perte de fonction)	-	Wnt-8C		-
Wnt9B	WNT9B	Wnt9b - Régulation transition mésenchymal/épithélial	-	Wnt-9A (WNT14) - Formations des		-

		- Induction des vésicules rénales		articulations		
Wnt10A	WNT10A - Dysplasie odonto-onycho-cutanée	Wnt10a	Wnt-10A	-	wnt10a	DWnt10
Wnt10B	WNT10B - Mutations chez patients obèses - Malformation dédoublement main/pied	Wnt10b - Adipogénèse - Régulation ostéoblastogénèse (Mutant perte de fonction)	Wnt-10B	-	wnt10b - Développement cérébral	-
Wnt11	WNT11	Wnt11 - Interfère avec la fonction rénale - Cardiogénèse	Wnt-11 OUI/NON - Cardiogénèse - Inducteur axe maternel Wnt11R - Morphogénèse cardiaque	Wnt-11 - Différenciation mésoderme - Développement du derme	wnt11 - Gastrulation (mouvements extension convergente ; cohésion des cellules) - Migration hypoblastes	-
Wnt16	WNT16	Wnt16 - Activé par facteur de transcription oncogénique E2A-Pbx1	-	-	wnt16	

Tableau 1 : Nomenclature des gènes Wnt et leurs orthologues dans différentes espèces. Phénotypes associés

Pour l'humain (*Homo sapiens*), le phénotype associé correspond à des mutations des gènes *Wnt* observées chez certains patients. Pour la souris (*Mus musculus*), le phénotype associé correspond à l'invalidation du gène ou à sa surexpression ectopique. Pour le xénope (*Xenopus laevis*), le phénotype associé correspond à (OUI/NON) à la duplication de l'axe en cas d'injection de l'ARNm dans les blastomères ventraux de l'embryon. Pour le poulet (*Gallus gallus*) et le poisson-zèbre (*Danio rerio*), le phénotype associé correspond à la surexpression ectopique du gène, un « knock-down » par utilisation d'antisens ou à des fonctions observées.

2. Structure des protéines

Les protéines Wnt ont un poids moléculaire variant de 39KDa (Wnt-7a) à 46KDa (Wnt10a), et possèdent un peptide signal. Elles partagent 27% à 83% d'identité, et conservent un patron de 23-24 résidus cystéines vraisemblablement reliés par des ponts disulfures. Peu de choses sont connues sur la structure tertiaire des protéines Wnt dans la mesure où elles sont quasiment insolubles.

Afin de devenir fonctionnelles, les protéines Wnt doivent subir des modifications post-traductionnelles comprenant la glycosylation (Kikuchi et al. 2007; Reichsman et al. 1996). Il a été proposé que les protéoglycanes héparanes sulfates puissent jouer le rôle de co-récepteurs stabilisant les protéines Wnt (Lin et al. 1999).

Les protéines Wnt subissent aussi des palmitoylations accentuant leur caractère hydrophobe (Kikuchi et al. 2007; Willert et al. 2003).

Ces caractéristiques physico-chimiques combinées ont pendant longtemps rendu problématique la purification et l'administration des protéines Wnt. De nombreuses équipes ont travaillé à résoudre ce problème d'insolubilité et il a été possible d'utiliser des milieux conditionnés contenant des protéines Wnt biologiquement actives (Shibamoto et al. 1998; van Leeuwen et al. 1994). L'obtention d'outils puissants telle qu'une protéine Wnt1 recombinante et bioactive (Fahnert et al. 2004) ou d'anticorps dirigés contre certains Wnt a permis d'investiguer cette voie selon un nouvel angle (Moon et al. 2004).

3. Fonctions

La fonction des différents membres Wnt a été étudiée par l'utilisation du modèle d'injection d'ARNm Wnt dans les embryons de xénope. Ce test est basé sur l'observation selon laquelle l'injection d'ARNm Wnt1 dans les blastomères ventraux d'embryons de xénope à des stades précoces aboutit à la duplication de l'axe (McMahon et al. 1989). Les différences de phénotypes observés ont conduit à un modèle qui a permis de distinguer 2 sous-classes parmi la famille des Wnt qui employeraient 2 voies de signalisations différentes: la sous-famille comprenant Wnt1, 3, 3a, 7a activerait la voie canonique ; et la sous-famille comprenant Wnt2, 4, 5a, 5b, 6, 7b, 11 activerait les voies non canoniques.

C. Les récepteurs Frizzled

La compréhension du mécanisme de signalisation des Wnt a longtemps été ralentie par l'ignorance de leurs récepteurs. Plusieurs études génétiques et biochimiques ont mis en évidence que les protéines Fzd étaient des récepteurs à 7 segments transmembranaires pour les ligands Wnt (Bhanot et al. 1996; Huang et al. 2004).

Elles ont un important rôle régulateur dans le développement embryonnaire, et ont été associées à différentes formes de cancers, à l'hypertrophie cardiaque, à la schizophrénie et à la vitréorétinopathie exsudative familiale, à la fois chez les humains et les modèles animaux (Luo et al. 2007; Malaterre et al. 2007).

1. Gènes

Les gènes *frizzled* (*fzd*) ont été pour la première fois identifiés chez la drosophile par un criblage de mutations qui induisaient des défauts de polarisation dans les cellules épithéliales (Adler 2002; Vinson et al. 1987). Par la suite, il a été montré que ces gènes étaient retrouvés chez les métazoaires, incluant 10 membres chez les vertébrés, 4 chez la drosophile et 3 chez le nématode (Wang et al. 1996) (**Tableau 2**).

Des analyses de séquençage ont suggéré que les 10 gènes *fzd* pouvaient être répartis en 4 groupes (Fredriksson et al. 2003):

Fzd1, Fzd2, Fzd7 partagent approximativement 75% d'identité ;

Fzd5 et Fzd8, 70% ;

Fzd4, Fzd9 et Fzd10, 65% ;

Fzd3 et Fzd6, 50%

<i>Mus musculus</i>				
Gène	Interactions avec les Wnt	Autres effets	Phénotypes des mutants	
Fzd1 (Fz1)				
Fzd2				
Fzd2-rs1 (Mfz2)				
Fzd2-rs2 (FZD2)				
Fzd3 (Mfz3)	<ul style="list-style-type: none"> - n'interagit pas avec Wg - interagit avec Wnt4 (axones commissurales) 	<ul style="list-style-type: none"> - Active la PKC - Stabilise la β-caténine 	<ul style="list-style-type: none"> - Anomalies dans système nerveux central - Guidance antero-postérieure des axones commissurales 	
Fzd4 (Mfz4)	<ul style="list-style-type: none"> - interagit avec Wg 	<ul style="list-style-type: none"> - Active la PKC - Stabilise la β-caténine (avec Wnt5a) - Internalisé après interaction avec Wnt5a - Active la voie Wnt canonique avec Norrin, Wnt5a et LRP5 	<ul style="list-style-type: none"> - Défauts dans l'oesophage, le cervelet et l'oreille - Empêche la formation du corps lutéal 	
Fzd5 (Mfz5)			<ul style="list-style-type: none"> - Anomalies de l'angiogenèse placentaire et du sac vitellin - Phénotype des cellules de Paneth - Potentiel neural dans le développement rétinial (Xénope) - Survie neuronale dans le noyau parafasciculaire - Développement oculaire 	

Fzd6 (Mfz6)	- n'interagit pas avec Wg - n'interagit pas avec XWnt-8	- Active la PKC	- Anomalies de mise en place du système pileux
Fzd7 (Mfz7)	- interagit avec Wg - interagit avec XWnt-8	- Active la transcription des gènes siamois et Xnr3 - Stabilise la β -caténine avec Wnt5a	
Fzd8 (Mfz8)	- interagit avec Wnt2	- Active la transcription des gènes siamois et Xnr3 - Active la voie Wnt canonique avec R-Spondin	
Fzd9 (Mfz9)			- Développement des cellules B - Défauts de l'hippocampe
Fzd10			
Smo (smoothened)	- Smo fait partie du système Hedgehog et ne lie aucun Wnt		- Absence d'asymétrie D/G - Anomalies de morphogénèse cardiaque

Homo sapiens

Gène	Interactions avec les Wnt	Autres effets	Phénotypes des mutants
FZD1			
FZD2			
FZD3			
FZD4			- Défauts d'angiogenèse rétinale dans FEVR (Vitréorétinopathie exsudative familiale)
FZD5	- interagit avec Wg - interagit avec XWnt-5A dans le test de duplication de l'axe chez Xénope		

FZD6			
FZD7			- Auto renouvellement des cellules souches embryonnaire humaine
FZD8			
FZD9		- interagit avec Wg	
FZD10			
SMOH			

Tableau 2 : Nomenclature des gènes Fzd. Phénotypes associés

Pour la souris (*Mus musculus*), le phénotype associé correspond à l'invalidation du gène ou à sa surexpression ectopique. Pour l'humain (*Homo sapiens*), le phénotype associé correspond à des mutations des gènes Fzd observées chez certains patients.
D'après <http://www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html>

2. Structure des protéines

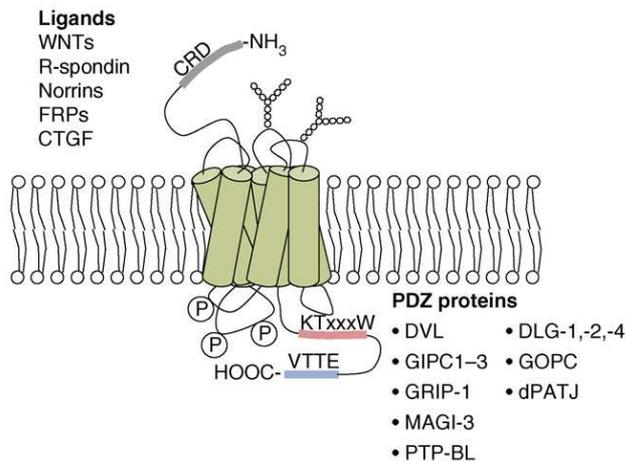


Figure 2 : Vue schématique du modèle à 7 domaines transmembranaires de Fzd
D'après (Schulte et al. 2007)

Les gènes *fzd* codent pour des protéines dont la séquence varie de 500 à 700 acides aminés (aa) (**Figure 2**). La partie N-terminale extracellulaire comporte un domaine riche en cystéines ou Cystein rich Domain (CRD) suivi d'une région hydrophile. Ce domaine CRD qui comporte 10 résidus cystéine conservés, chacun d'entre eux formant des ponts disulfures, peut lier les lipoglycoprotéines de la famille Wnt. Mais des études ont montré qu'il pouvait aussi lier des protéines d'autres familles, comme celles de la famille des sFRPs (soluble Frizzled-related proteins) (Bafico et al. 1999; Rodriguez et al. 2005), des R-spondines (Nam et al. 2006) ou encore les ligands Norrins (Smallwood et al. 2007; Xu et al. 2004). Enfin, les récepteurs Fzd peuvent se dimériser entre eux via une interaction entre domaines CRD/CRD (Dann et al. 2001), importante pour la maturation et l'exposition à la membrane plasmique de la protéine (Kaykas et al. 2004).

Les protéines contiennent ensuite 7 segments hydrophobes qui caractérisent ces récepteurs transmembranaires.

En Nterminal, des analyses de séquence et de mutations ont révélé la présence d'un domaine de liaison intracellulaire au domaine PDZ (PSD-95/dics large/ZO-1 homologous), permettant aux récepteurs Fzd d'interagir avec d'autres protéines à domaine PDZ, comme la protéine centrale Dishevelled (Chen et al. 2003; Wong et al. 2003) ou encore une protéine impliquée dans le trafic vésiculaire, GIPC1-3 ou synectine (Dann et al. 2001; Tan et al. 2001). Ce motif (KTXXXW) intracytoplasmique situé après le 7^{ième} segment transmembranaire est hautement conservé au sein des Fzd et serait nécessaire à l'activation de la voie Wnt.

Le reste de la queue intracytoplasmique du récepteur Fzd est moins bien conservé entre les membres, et contient une séquence de liaison aux ligands à domaine PDZ plus classique.

La séquence Fzd est riche en sites consensus serine/threonine et tyrosine kinase. La présence d'un domaine 7 fois transmembranaire rappelle les récepteurs classiques couplés aux protéines G, et en effet, les Fzd ont été listés comme nouvelle famille en plus des GPCR (G protein-coupled receptor) : « La classe des Frizzled » (Foord et al. 2002).

3. Localisation

Les protéines Fzd sont localisées à la surface des cellules qui répondent aux ligands Wnt, même s'il a été montré qu'elles pouvaient être internalisées dans la cellule afin de réguler la fonction Wnt via un mécanisme dépendant de la β -arrestine (Chen et al. 2003; Dubois et al. 2001).

Leur localisation joue aussi un rôle dans l'activation des voies de signalisation, notamment dans l'établissement de la polarité cellulaire chez la drosophile (voie PCP) qui nécessite une localisation subcellulaire asymétrique de Fzd (Montcouquiol et al. 2006; Strutt 2001).

En général, elles sont exprimées de façon large et dynamique, et l'expression « tissu-spécifique » des Fzd est très complexe. Des profils spécifiques d'expression ont été déterminés dans différents modèles que ce soit pour la souris, la drosophile (Wang et al. 1996), le nématode (Thorpe et al. 2000) ou encore le xénope (Gradl et al. 1999).

4. Mécanisme d'activation

Les récepteurs Fzd peuvent activer les 3 principales voies de signalisation du système Wnt/Fzd que l'on décrira par la suite. Mais les mécanismes biochimiques par lesquels la liaison de Wnt à Fzd induit une transduction du signal restent encore mal compris.

Les facteurs Wnt se lient aux récepteurs Fzd avec une forte affinité via le domaine CRD de Fzd (Dann et al. 2001; Rulifson et al. 2000). On ne sait pas réellement si cette liaison induit un changement de conformation du récepteur Fzd. Mais même si ce domaine est nécessaire à sa liaison au ligand, il ne semble pas être indispensable à la transduction du signal (Bockaert et al. 1999; Chen et al. 2004; Povelones et al. 2005). En revanche, la dimérisation des récepteurs Fzd pourrait à elle-seule induire l'activation de la voie canonique (Carron et al. 2003).

L'activation des récepteurs Fzd conduit ainsi au recrutement à la membrane et à l'activation de la protéine Dishevelled (Boutros et al. 2000; Veeman et al. 2003), et ce, via une interaction directe avec le domaine PDZ.

D. Lipoprotein Receptor-related Proteins 5/6 (LRP5/6)

Des études ont permis de constater que d'autres récepteurs que les récepteurs Fzd étaient impliqués dans la transduction du signal des Wnt. Un de ces co-récepteurs est le co-récepteur LRP5/6, ou Lipoprotein Receptor-related protein 5/6.

Les co-récepteurs LRP (LRP5/6 chez les vertébrés et Arrow chez la drosophile) sont des protéines transmembranaires qui peuvent se lier directement avec les Wnt et jouer un rôle essentiel dans la voie canonique. En effet, la surexpression de LRP active cette voie dépendante de la β -caténine (Tamai et al. 2000). De plus, la mutation de *arrow* chez la drosophile et de LRP chez la souris génère un mutant au phénotype très similaire à *wg* (Wehrli et al. 2000) et à *wnt* (Pinson et al. 2000).

Une étude a montré que Wnt pouvait se lier directement au domaine extracellulaire de LRP pour former une structure ternaire avec Fzd en créant un pontage entre Fzd et LRP (He et al. 2004; Tamai et al. 2000). Le domaine intracellulaire de LRP5 peut aussi interagir avec l'axine, un élément de la voie canonique qui agit en aval (Mao et al. 2001). Cette interaction dépend de la phosphorylation d'un motif PPPSPxS dans le domaine cytoplasmique de LRP6 par la casein kinase I γ (CKI γ) et la glycogène synthase kinase 3 (GSK3) (Davidson et al. 2005; Zeng et al. 2005) (**Figure 3**).

L'activation de la voie Wnt conduit ainsi au recrutement de l'axine à la membrane via LRP où elle sera inactivée et/ou dégradée, entraînant ainsi la stabilisation de la β -caténine.

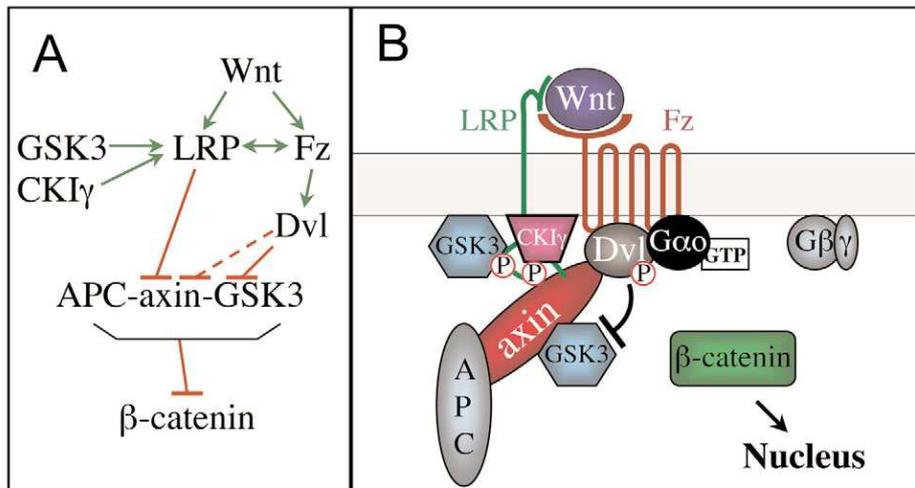


Figure 3 : Signalisation canonique engendrée par LRP

D'après (Cadigan et al. 2006)

De façon intéressante, des mutations de LRP5 chez l'humain affectent le développement osseux et de l'œil (Patel et al. 2002). De plus, LRP5 est spécifique de la signalisation Wnt5a (avec Fzd4) pour activer le rapporteur Wnt/ β -caténine (Mikels et al. 2006).

E. Dishevelled: Plaque tournante du système Wnt/Fzd

La protéine cytoplasmique Dishevelled (Dsh/Dvl) est un composant essentiel de la voie Wnt/Fzd puisqu'elle participe à l'activation des 3 voies de signalisations. On la désigne plaque tournante du système Wnt/Fzd (**Figure 1**). Ainsi, la liaison spécifique entre un ligand Wnt et un récepteur Fzd aboutit à l'activation de Dvl. En fonction de la spécificité de liaison, Dvl va activer un ensemble de protéines spécifiques qui lui sont associées et permettre l'activation de telle ou telle voie. Mais le mécanisme utilisé par Dvl pour transduire le signal Wnt n'est pas encore clair.

Le gène *dishevelled* (*dvl*) de la drosophile a été le premier membre de la famille à être cloné (Klingensmith et al. 1994). Les protéines Dvl ont été identifiées chez tous les organismes modèles qui emploient la voie Wnt/Fzd à savoir l'hydre, le nématode, le xénope, la souris et l'homme (<http://www.stanford.edu/~rnusse/axindshtcf/dishevell.html>). Chez les mammifères, il existe 3 homologues du gène *dvl* de la drosophile : *dvl1*, 2 et 3 (Semenov et al. 1997; Sussman et al. 1994; Yang et al. 1996), dont les phénotypes ont tous été caractérisés chez la souris (**Tableau 3**).

Gène	Phénotype
mDvl1	- Défauts comportementaux et moteurs (Lijam et al. 1997) - Ouverture du tube neural avec le double KO Dvl2 (Hamblet et al. 2002) - Défaut d'extension convergente (Wang et al. 2006)
mDvl2	- Anomalies cardiaques (Hamblet et al. 2002) - Ouverture du tube neural avec le double KO Dvl1 (Hamblet et al. 2002) - Défaut d'extension convergente (Wang et al. 2006)
mDvl3	- Anomalies cardiaques (Etheridge et al. 2008)

Tableau 3 : Nomenclature des gènes *dvl* pour la souris (*Mus musculus*). Phénotypes associés

Le phénotype associé correspond à l'invalidation du gène.

D'après <http://www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html>

1. Structure de Dishevelled

Les propriétés de « décision » en terme de voie de signalisation empruntée semblent incomber à la structure même de cette protéine (**Figure 4**). En effet, Dvl est une protéine à modules multiples qui fait environ 500 à 600 acides aminés. Elle est composée de 3 domaines

conservés appelés DIX, PDZ et DEP. Il existe aussi une région basique comprenant des résidus sérine et thréonine conservés, sites potentiels de phosphorylation.



Figure 4: Représentation schématique de la structure modulaire de Dishevelled

D'après (Cadigan et al. 1997).

Plusieurs études suggèrent que Dvl active les différentes voies de signalisation Wnt/Fzd par le biais des différents domaines (Li et al. 1999). Des études par mutations ont permis d'allouer aux domaines de Dvl des fonctions particulières. Ainsi, des mutations dans le domaine DIX affectent la voie de signalisation canonique, tandis que des mutations dans le domaine DEP affectent la voie PCP (Axelrod et al. 1998; Penton et al. 2002; Wallingford et al. 2000).

Le domaine DIX situé en N-terminal fonctionne donc principalement dans la voie canonique (Kishida et al. 1999; Penton et al. 2002). Son nom provient du fait qu'on le retrouve à la fois dans **D**ishevelled mais aussi dans l'**a**Xine. Ce domaine peut interagir avec lui-même *in vitro* et *in vivo* ; il joue donc un rôle dans la dimérisation de Dvl et dans son interaction avec l'axine, créant un assemblage dynamique de protéines nécessaire à l'activation de la signalisation (Itoh et al. 2000; Julius et al. 2000; Kishida et al. 1999; Schwarz-Romond et al. 2007).

De façon contradictoire, il a été montré que le domaine DIX de Dvl pouvait agir dans la voie PCP (Axelrod et al. 1998; Wallingford et al. 2000) ou non (Boutros et al. 1998). Il semblerait que la propriété d'intervenir dans 2 voies différentes via le domaine DIX dépende de la localisation de la protéine.

Le domaine PDZ, pour PSD-95, DLG, ZO1 (les 3 premières protéines découvertes avec ce domaine PDZ), est un domaine impliqué dans les interactions protéine-protéine, dans la transduction du signal et dans les jonctions cellulaires comme les jonctions serrées ou les jonctions synaptiques des cellules épithéliales. Pour Dvl, il permettrait l'interaction avec d'autres partenaires, incluant Fzd, les kinases CKI et Par-1, et les médiateurs de la voie canonique Frodo et Dapper (Cheyette et al. 2002). De part ses nombreuses associations, le domaine PDZ semble fonctionner à la fois dans les voies canonique et non canonique. Il a aussi été récemment montré que le domaine PDZ était essentiel à la transduction de la signalisation Wnt (Grandy et al. 2009). En effet, l'utilisation d'une petite molécule se fixant au domaine PDZ de Dvl a montré qu'elle pouvait bloquer la voie canonique.

En C-Terminal, le domaine DEP, pour **Dishevelled**, **EGL-10**, **Pleckstrin** (domaine retrouvé dans ces trois protéines), est essentiel aux interactions protéine-protéine nécessaires à la voie PCP, comme avec la GTPase Rac (Axelrod et al. 1998; Boutros et al. 1998; Penton et al. 2002). Des mutations de ce domaine affectent notamment l'activation de la voie JNK mise en jeu dans la voie PCP (Moriguchi et al. 1999). Il serait également impliqué dans la localisation membranaire de Dvl sous la stimulation du signal Wnt, nécessaire à l'activation des voies canonique (Pan et al. 2004) et non canonique (Park et al. 2005).

Cependant, malgré ces informations, le mécanisme par lequel Dvl transduit telle ou telle voie de signalisation n'est pas encore clair.

2. Localisation de Dishevelled

La localisation subcellulaire de Dvl joue un rôle central dans la spécificité d'induction des différentes voies de signalisation Wnt. En effet, la particularité de Dvl est de former de gros amas punctiformes via son domaine DIX au niveau du cytoplasme lorsqu'il est surexprimé (Schwarz-Romond et al. 2007; Yang-Snyder et al. 1996). Dvl endogène s'organise aussi en points cytoplasmiques (Miller et al. 1999; Smalley et al. 1999). Sa localisation est donc généralement cytoplasmique, où il peut être aussi en complexe avec les microtubules ou le cytosquelette d'actine (Ciani et al. 2004; Krylova et al. 2000; Torres et al. 2000), ou associé aux vésicules lipidiques cytoplasmiques (Capelluto et al. 2002). D'ailleurs, cette localisation va spécifier l'activation de la voie canonique ou non. En effet, si Dvl est localisé dans les vésicules cytoplasmiques, la voie Wnt/ β -caténine est activée alors que si Dvl se retrouve au niveau des fibres de stress, la signalisation est bloquée. Cette localisation différentielle est sous le contrôle du domaine DIX (Capelluto et al. 2002).

L'activation des voies canonique et non canonique nécessite le recrutement de Dvl à la membrane. Lors de l'activation de la voie canonique par Wnt3a, Dvl est relocalisé à la membrane plasmique au fur et à mesure de la stimulation (Schwarz-Romond et al. 2007; Yokoyama et al. 2007), même si une étude a montré que cette signalisation canonique semblait pouvoir être aussi activée avec Dvl localisé dans le cytoplasme (Park et al. 2005).

En revanche, la relocalisation membranaire de Dvl semble être indispensable à l'activation de la signalisation PCP. Chez l'embryon du xénope, Dvl transloque à la membrane en réponse à Fzd1, un récepteur connu de la voie PCP (Axelrod et al. 1998; Rothbacher et al. 2000). Cette localisation membranaire est indispensable, notamment pour les mouvements cellulaires lors du développement embryonnaire du xénope (Park et al. 2005; Wallingford et al. 2005). En

effet, la séquestration de Dvl hors de la membrane plasmique empêche l'extension convergente lors de la gastrulation du xénope, en bloquant l'activation des GTPases Rho/Rac. Enfin, la signalisation canonique induit aussi une localisation périnucléaire de Dvl puisque l'exposition de cellules mésenchymateuses de souris à un stimulus Wnt résulte en une accumulation périnucléaire de Dvl (Torres et al. 2000).

Même si de nombreuses études se sont focalisées sur la localisation cytoplasmique de Dvl, un rôle de Dvl dans le noyau a été décrit et cette localisation nucléaire semble être nécessaire à l'activation de la voie canonique (Itoh et al. 2005). Itoh et al. a montré que Dvl endogène pouvait transloquer et s'accumuler dans le noyau en réponse à un Wnt. Ils ont identifié à la fois un signal d'import nucléaire (NLS) et un signal d'export nucléaire (NES) présents entre les domaines PDZ et DEP de la protéine Dvl de différents organismes. La mutation du NLS chez les embryons de xénope a empêché l'accumulation de Dvl dans le noyau, et a aboli sa capacité à induire des axes secondaires.

3. Implication de Dvl dans les voies de signalisation

Les voies canoniques et non canoniques induisent la phosphorylation de Dvl et son recrutement au niveau de la queue intracytoplasmique de Fzd à la membrane (Wong et al. 2003). Bien que les mécanismes d'action de Dvl ne soient pas bien connus, il interagit avec de nombreuses molécules, incluant la Casein Kinase 1 (CK1, (Peters et al. 1999; Sakanaka et al. 1999)) et la Casein Kinase 2 (CK2, (Song et al. 2003; Willert et al. 1997), qui sont 2 kinases indépendantes, et la kinase Par-1 (Guo et al. 1995; Sun et al. 2001) (**Figure 5**).

CK1 semble être importante pour la signalisation Wnt, à la fois chez le Xénope et le *C.elegans* (Peters et al. 1999).

Par-1 agit comme un régulateur positif de la signalisation Wnt chez la Drosophile et dans d'autres systèmes. Elle peut phosphoryler Dvl d'une manière directe. En 2005, Ossipova et al. a suggéré que Par-1A et Par-1BX étaient essentielles pour la voie canonique (Ossipova et al. 2005).

Dans la voie canonique, l'activation et le recrutement à la membrane de Dvl permettent le recrutement de l'axine (et du reste du complexe de dégradation) à la membrane qui peut alors interagir avec la queue intracytoplasmique de LRP 5/6. L'activation de Dvl permet aussi le recrutement de la protéine de liaison à GSK3 β , la GSK3 β Binding Protein (GBP/Frat1). L'interaction avec ces partenaires permettent la continuité de la voie canonique.

Les protéines Frodo et Dapper interagissent aussi avec le domaine PDZ, de préférence avec une forme hyperphosphorylée de Dvl. Ces molécules jouent respectivement le rôle d'agoniste (Gloy et al. 2002) et d'antagoniste (Cheyette et al. 2002) de Dvl dans la voie canonique.

Dans les voies non canoniques, Dvl peut aussi interagir avec certaines protéines comme les protéines Van gogh/Strabismus via le domaine PDZ (Park et al. 2002; Torban et al. 2004), Prickle via le domaine DEP (Jenny et al. 2003; Tree et al. 2002), Diego et Daam via le domaine DEP (Habas et al. 2001). Les interactions avec ces nouveaux partenaires permettent l'activation de la voie PCP.

II. La voie canonique Wnt/Fzd

Cette voie de signalisation est initiée par la liaison du ligand Wnt au récepteur Fzd et au co-récepteur LRP 5/6.

En l'absence de ligand Wnt (**Figure 6A**), la β -caténine cytosolique est recrutée dans un complexe qui va permettre sa dégradation. Ce complexe est constitué de l'Adenomatous Poliposis Coli (APC), de l'axine et de la GSK3 β qui va favoriser la phosphorylation de la β -caténine. Ceci conduit à l'ubiquitinylation de la β -caténine et donc à son ciblage vers le protéasome qui va assurer sa dégradation. Dans le noyau, les gènes cibles potentiels de cette voie sont réprimés par l'action de facteurs de transcription de la famille Lymphoid Enhancer-binding Factor (LEF) / T-cell Factor (TCF) qui sont associés à des co-répresseurs. Dans cette configuration, les cellules maintiennent un niveau bas de β -caténine cytosolique et nucléaire tandis qu'une autre partie se retrouve associée aux cadhérines présentes à la membrane plasmique (Nelson et al. 2004).

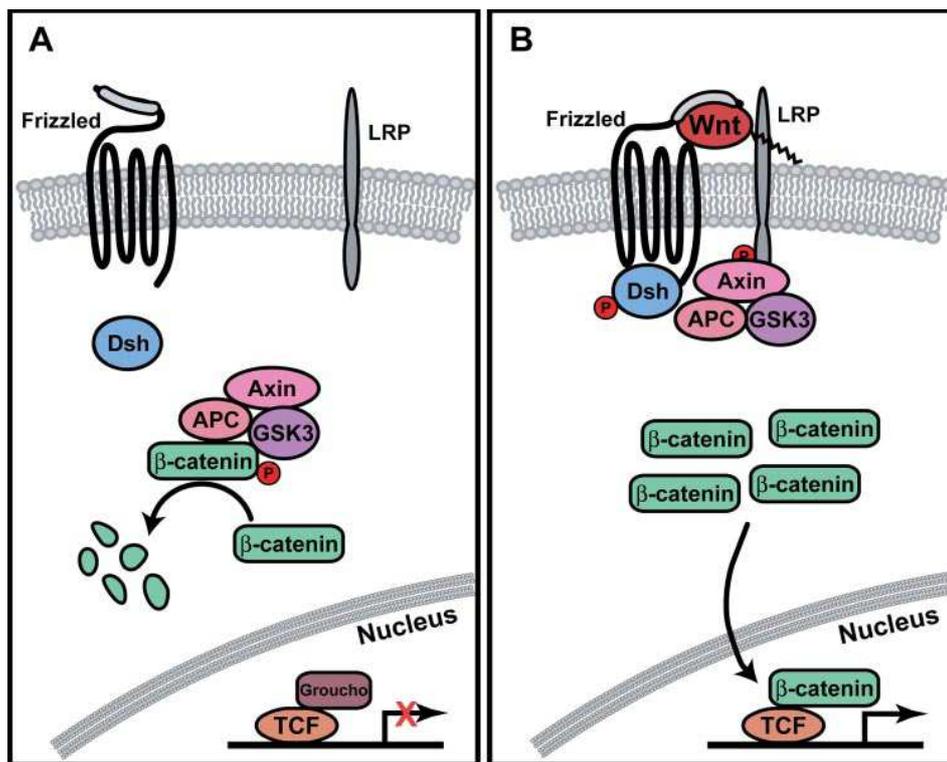


Figure 6: Illustration de la voie canonique Wnt/Frizzled
D'après (Gordon et al. 2006)

En présence de ligand Wnt (**Figure 6B**), la protéine Dvl est activée par sa phosphorylation. L'activation et le recrutement à la membrane de cette protéine permettent vraisemblablement le recrutement de l'axine (et du reste du complexe de dégradation) à la membrane qui peut alors interagir avec la queue intracytoplasmique de LRP 5/6. L'axine est alors dégradée, ce qui favorise la destructuration du complexe de dégradation et protège la β -caténine cytosolique (Tolwinski et al. 2004). L'activation de Dvl permet aussi l'inhibition de la GSK3 β , ce qui à nouveau permet de diminuer la phosphorylation de la β -caténine et sa dégradation. Ainsi, l'activation de la voie canonique permet une stabilisation post-traductionnelle de la β -caténine par une dégradation de l'axine et une inhibition de la GSK3 β qui sont dépendantes des Wnt. A mesure que le taux de β -caténine cytosolique augmente, celle-ci peut être transloquée dans le noyau pour interagir avec les facteurs LEF/TCF liés à l'ADN et transactiver l'expression de gènes cibles.

Cette voie est régulée au niveau intracellulaire par des mécanismes dépendants et indépendants des facteurs Wnt car de nombreux membres de cette voie peuvent interagir avec les voies non canoniques (Dvl par exemple) mais aussi avec d'autres voies de signalisation. Ainsi, on a pu constater que ILK (Integrin-Linked Kinase), kinase intervenant dans la voie des

intégrines, peut inhiber la GSK3 β et stabiliser la β -caténine cytosolique, et donc permettre l'activation de ses gènes cibles (Tan et al. 2001). A l'opposé, le suppresseur de tumeur p53 favorise la dégradation de la β -caténine (Levina et al. 2004). De plus, la GSK3 β est régulée par d'autres voies de signalisation (Doble et al. 2003).

Le rôle de ces interrelations et leur répercussion au niveau de la physiopathologie restent assez méconnus.

A. Le complexe de dégradation APC-Axine-GSK3 β

1. Adenomatous Polyposis Coli (APC)

La protéine APC est une protéine de taille relativement importante (312 KDa) qui a de multiples rôles dans la cellule comme l'adhésion, la migration et la régulation du cycle cellulaire (Peifer et al. 2000). Dans la signalisation Wnt, elle interagit avec la β -caténine et l'axine, et antagonise la voie canonique (Fearnhead et al. 2001) (**Figure 7**).

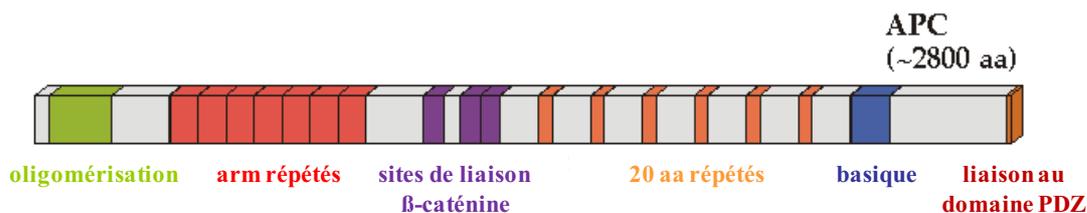


Figure 7: Représentation schématique d'APC

D'après <http://www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html>

Son rôle majeur intervient dans la tumorigenèse. En effet, *APC1* humain est un gène suppresseur de tumeur du cancer du colon (Giles et al. 2003). L'absence ou la perte de fonction d'APC, *in vivo*, provoque une forte accumulation de la β -caténine dans des cellules épithéliales coliques humaines, semblant être à l'origine de l'apparition du cancer (Iwamoto et al. 2000). Cette fonction est reliée à son rôle de régulateur négatif de la voie canonique, car elle facilite et participe à la formation du complexe de dégradation visant à contrôler le niveau de β -caténine cytosolique (Fodde 2002).

2. Axine

La stabilisation de la β -caténine lors de l'activation de la voie canonique requiert aussi la dégradation de l'axine. La reconnaissance de l'APC par l'axine se fait par le domaine RGS (regulator of G protein signaling), tandis que celle de Dvl, par le domaine DIX (**Figure 8**).



Figure 8: Représentation schématique de l'axine

D'après <http://www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html>

En l'absence de facteurs Wnt, cette protéine a pour fonction de rassembler les différents membres du complexe de dégradation afin de faciliter la dégradation de la β -caténine (Hamada et al. 1999; Willert et al. 1999).

En présence des facteurs Wnt, l'axine est déphosphorylée, aboutissant à une diminution de son affinité pour la β -caténine et à son relargage du complexe de destruction (Jho et al. 1999; Willert et al. 1999; Yamamoto et al. 1999). De plus, comme les facteurs Wnt induisent rapidement la phosphorylation de la queue intracytoplasmique des LRP5/6, l'affinité de l'axine pour LRP5/6 augmente, permettant son recrutement à la membrane (Tamai et al. 2004). L'axine est alors dégradée, ce qui favorise la destruction du complexe de dégradation et protège la β -caténine cytosolique (Tolwinski et al. 2004).

Cependant, un autre modèle met en jeu Dvl, qui sous la stimulation Wnt, est relocalisé à la membrane. Les polymères membranaires de Dvl serviraient d'échafaudage pour le recrutement de l'axine et son inactivation (Cliffe et al. 2003; Roberts et al. 2007).

3. Glycogen Synthase Kinase 3 β (GSK3 β)

La GSK3 β est une sérine/thréonine kinase de poids moléculaire de 47 KDa (**Figure 9**).

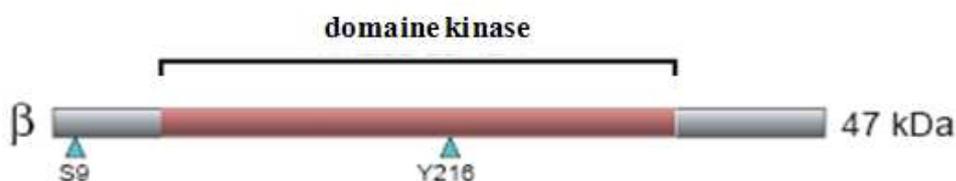


Figure 9: Représentation schématique de la GSK3 β

D'après (Doble et al. 2003)

La GSK3 β est retrouvée chez tous les eucaryotes, et est au centre de la régulation de nombreuses voies de signalisation comme les voies Notch, Hedgehog et de l'insuline, ainsi que la voie Wnt/Fzd canonique. Cette enzyme régule diverses fonctions cellulaires en agissant sur une quarantaine de substrats (Jope et al. 2004). Ceci suggère que l'activité de la GSK3 β doit être étroitement régulée dans la cellule par des mécanismes qui discriminent ses cibles

potentielles, de sorte à ne pas intervenir dans toutes les voies de signalisation de façon simultanée.

Ce contrôle précis de l'activité de la GSK3 β peut s'effectuer grâce à la combinaison d'évènements de phosphorylations, de localisations et d'interactions spécifiques avec ses partenaires. Elle peut être régulée par la phosphorylation de certains résidus. Son activité est réduite lorsqu'elle est phosphorylée sur la sérine 9. En plus de la régulation par la phosphorylation, les mécanismes qui contrôlent la localisation subcellulaire de la GSK3 β contrôlent nécessairement son accessibilité aux substrats. Cette enzyme, qui est principalement retrouvée dans le compartiment cytoplasmique, peut parfois être localisée dans le noyau ou dans les mitochondries où elle est très active (Bijur et al. 2001). Enfin, le 3^{ème} type de régulation est celui qui a lieu lorsque la GSK3 β interagit avec des protéines spécifiques : le cas le mieux décrit est celui que l'on retrouve dans la voie Wnt canonique lors de la formation du complexe de dégradation de la β -caténine. Ce système de régulation apparaît être indépendant de celui impliquant la phosphorylation de la GSK3 β en sérine 9.

Lors de la voie canonique, la GSK3 β est en complexe avec l'APC et l'axine qui favorise la phosphorylation de la β -caténine sur des résidus d'acides aminés spécifiques pour la GSK3 β . Cette phosphorylation va marquer la protéine et induire sa dégradation dans le protéasome.

La β -caténine possède dans son domaine N-terminal trois résidus sérine/thréonine (Ser33, Ser37, Thr41) correspondant aux sites consensus de phosphorylation de la GSK3 β (Aberle et al. 1997). Mais, sans la présence de l'axine, la GSK-3 β ne parvient pas à phosphoryler la β -caténine *in vitro*. Une étude a montré que cette phosphorylation de la β -caténine était en fait effectuée de façon séquentielle par deux kinases : la CKI α et la GSK3 β (Liu et al. 2002). La phosphorylation de Ser45 par CKI α sert d'amorce à la phosphorylation des résidus Thr41, Ser37 et Ser33 par GSK-3 β . CKI α et GSK-3 β se lient à différentes régions de l'axine et prennent la β -caténine "en tenaille" pour la phosphoryler.

La GSK3 β phosphoryle aussi l'axine (Willert et al. 1999; Yamamoto et al. 1999) et APC (Rubinfeld et al. 2001), ce qui accroît leur affinité pour lier la β -caténine.

B. La protéine centrale de la voie canonique : la β -caténine

1. Structure et localisation

La β -caténine est une sous-unité du complexe cadhérine. Cette protéine est l'orthologue mammifère d'Armadillo chez la drosophile. Elle est aussi un médiateur clé de la signalisation Wnt.

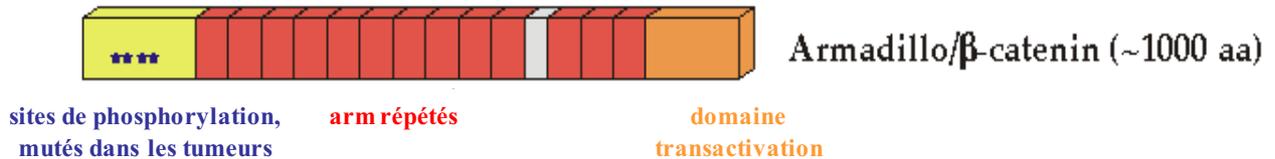


Figure 10: Représentation schématique de la β -caténine

D'après <http://www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html>

Structurellement, la β -caténine est composée de 3 domaines (**Figure 10**).

En N-terminal, on trouve une région qui possède de multiples sites de phosphorylation pour la GSK3 β et la CKI, et un site de fixation (Ser33/37) à la protéine β -TrCP (β -transducin repeat-containing protein), initiateur du processus de dégradation par le protéasome.

Le domaine central comprend 12 domaines Armadillo Repeat Domain (ARD). Dans ce domaine, il existe des sites de liaison à la protéine APC, à l'axine, à la E-cadhérine et au facteur de transcription TCF (von Kries et al. 2000). Ces ARD sont nécessaires à la relocalisation de la β -caténine au niveau de l'enveloppe nucléaire et à sa translocation (Funayama et al. 1995).

Enfin, en C-terminal, on trouve un domaine ayant une fonction de signalisation par sa capacité à activer la transcription (van de Wetering et al. 1997).

Il existe en fait trois pools de β -caténine dans la cellule : un associé aux membranes avec les cadhérines. Un autre, sous forme soluble dans le cytoplasme associé à APC, dont l'état et la concentration sont primordiaux pour la transduction du signal Wnt canonique. Le dernier correspond au pool nucléaire de la β -caténine impliqué dans la transcription de ses gènes cibles.

2. Régulation dans la voie Wnt canonique

En l'absence de ligands Wnt, le complexe formé autour de l'axine/APC/GSK3 β mène à la phosphorylation de la β -caténine par GSK3 β et CKI, et est prise en charge par β -TrCP qui

catalyse son ubiquitinylation. Le protéasome 26S va alors pouvoir la reconnaître et la dégrader.

L'activation de la voie Wnt canonique permet une stabilisation post-traductionnelle de la β -caténine par une dégradation de l'axine et une inhibition de la GSK3 β qui sont dépendantes des Wnt. A mesure que le taux de β -caténine cytosolique augmente, celle-ci peut être transloquée dans le noyau pour interagir avec les facteurs LEF/TCF liés à l'ADN pour transactiver l'expression de gènes cibles.

3. Régulation transcriptionnelle : rôle des facteurs LEF/TCF

Une fois dans le noyau, la β -caténine ne se lie pas directement à l'ADN mais intervient en tant que co-facteur essentiel pour les facteurs de transcription de la famille LEF/TCF (**Figure 1**).

Chez l'Humain, cette famille compte 4 membres : TCF1, LEF1, TCF3 et TCF4. Ces protéines contiennent des boîtes High mobility Group (HMG) qui leur permettent de se lier à l'ADN de façon spécifique mais sont dépourvues de domaine transactivateur traditionnel (Giese et al. 1992). Les TCF doivent donc se lier à la β -caténine pour assurer la transactivation des gènes cibles (Molenaar et al. 1996; van de Wetering et al. 2002).

En l'absence de signalisation Wnt, les facteurs LEF/TCF se lient à une famille de répresseurs transcriptionnels largement exprimée qu'est la famille Groucho (Brantjes et al. 2001; Roose et al. 1998). Ces facteurs répriment la transcription en aidant au recrutement d'histones déacétylases (HDAC) qui agissent en condensant la chromatine.

La liaison de la β -caténine aux facteurs LEF/TCF lève cette répression transcriptionnelle. La β -caténine peut recruter une acétyltransférase CREB Binding Protein (CBP) au niveau de promoteurs spécifiques, ce qui permet l'acétylation des histones. Ceci entraîne un relâchement local de la chromatine, permettant une meilleure accessibilité de la machinerie transcriptionnelle, et donc une transactivation du gène cible (Takemaru et al. 2000). De plus, la β -caténine peut recruter la protéine Brg1 (brahma-related gene 1), un membre du complexe SWI/SNF (SWItch/Sucrose NonFermentable), qui facilite le remodelage de la chromatine, prérequis pour la transcription (Barker et al. 2001).

Deux autres acteurs clés participent aussi à la transactivation des gènes cibles, appelés Legless et Pygopus (Kramps et al. 2002).

Puisque la signalisation Wnt/ β -caténine régule la prolifération et la différenciation des cellules dans de nombreux stades développementaux et pour l'homéostasie tissulaire adulte,

les gènes cibles de la voie canonique sont divers et spécifiques du contexte cellulaire (Logan et al. 2004; MacDonald et al. 2009; Vlad et al. 2008).

Parmi les premiers gènes identifiés comme étant régulés par β -caténine/TCF, les gènes *c-Myc* (He et al. 1998), *cycline D1* (Tetsu et al. 1999) et *c-Jun* (Mann et al. 1999) lient invariablement la voie Wnt canonique à la prolifération cellulaire et son dysfonctionnement à l'apparition du cancer.

Les composants de la voie Wnt, incluant Fzd, LRP6, Axin2, TCF/LEF, Dkk1 et Rspo sont aussi régulés par TCF/ β -caténine, positivement ou négativement (MacDonald et al. 2009).

D'autres gènes cibles ont été identifiés et rentrent en compte dans l'explication des processus biologiques joués par cette voie de signalisation. Une liste de ces gènes cibles est mise à jour régulièrement et peut être consultée sur le site :

<http://www.stanford.edu/~rnusse/pathways/targets.html>.

III. Les voies dites non canoniques Wnt/Frizzled

La recherche dans le domaine de la signalisation Wnt/Fzd a longtemps été centrée sur une seule voie de signalisation Wnt: la voie canonique dépendante de la β -caténine. Cependant, depuis ces 15 dernières années, un nombre croissant de travaux viennent démontrer l'implication de voies non canoniques, souvent dites voies indépendantes de la β -caténine (Veeman et al. 2003). Elles peuvent être divisées en 2 branches distinctes : la voie de polarité planaire cellulaire (PCP ou Planar Cell Polarity) et la voie calcium-dépendante (Wnt/ Ca^{2+}) (**Figures 1, 12 et 17**).

Les voies de signalisation non-canoniques ont été mises en évidence dans les mouvements cellulaires ayant lieu lors de la gastrulation des vertébrés (Myers et al. 2002), en particulier chez le xénope. Ce sont les membres de la classe Wnt5a (Wnt2, 4, 5a, 5b, 6, 7b, 11) qui activeraient les voies non canoniques. Ces voies seraient ainsi à l'origine d'anomalies lors de mouvements cellulaires au cours de la gastrulation chez le xénope (Du et al. 1995; Moon et al. 1993).

Les voies de signalisation non-canoniques contrôlent donc les mouvements cellulaires qu'on englobe sous le terme de "convergence extension" (Veeman et al. 2003; Wallingford et al. 2002). Ces mouvements se retrouvent en plusieurs endroits où des déformations de tissus se produisent et servent à allonger l'axe antéropostérieur du corps (Keller 2002). L'intercalation et l'allongement coordonnés de cellules au sein d'un tissu permettent ces déformations.

A. La voie de polarité planaire cellulaire (PCP)

La voie de signalisation PCP a émergé d'études génétiques réalisées chez la drosophile dans lesquelles des mutations de Fzd et de Dvl l'ont impliquée dans l'orientation des structures épithéliales (Fanto et al. 2004; Mlodzik 2002; Strutt 2003).

Les cellules de l'épithélium sont connues pour posséder une polarité apico-basolaterale, mais elles sont aussi polarisées le long du plan de la couche épithéliale. Chez la drosophile, cette organisation régit l'orientation des structures comprenant l'orientation des follicules de poils, les soies et l'organisation hexagonale des ommatidies de l'œil (Mlodzik 2002). Chez les vertébrés, ce système est à la base de l'organisation des cils de l'épithélium sensoriel dans l'oreille interne (Montcouquiol et al. 2003), de l'orientation des poils (Guo et al. 2004) et de la migration des cellules mésodermes dorsales durant la gastrulation (Wang et al. 2007) (**Figure 11**).

La voie PCP met en jeu la régulation du cytosquelette d'actine pour une organisation polarisée des structures et une migration dirigée. Cette voie semble fonctionner indépendamment de la transcription. Ainsi, par le biais d'interactions spécifiques avec certains récepteurs Fzd et d'autres corécepteurs, les membres de la classe Wnt5a sont susceptibles de médier ces effets par l'activation de la voie PCP (Du et al. 1995; Moon et al. 1993).

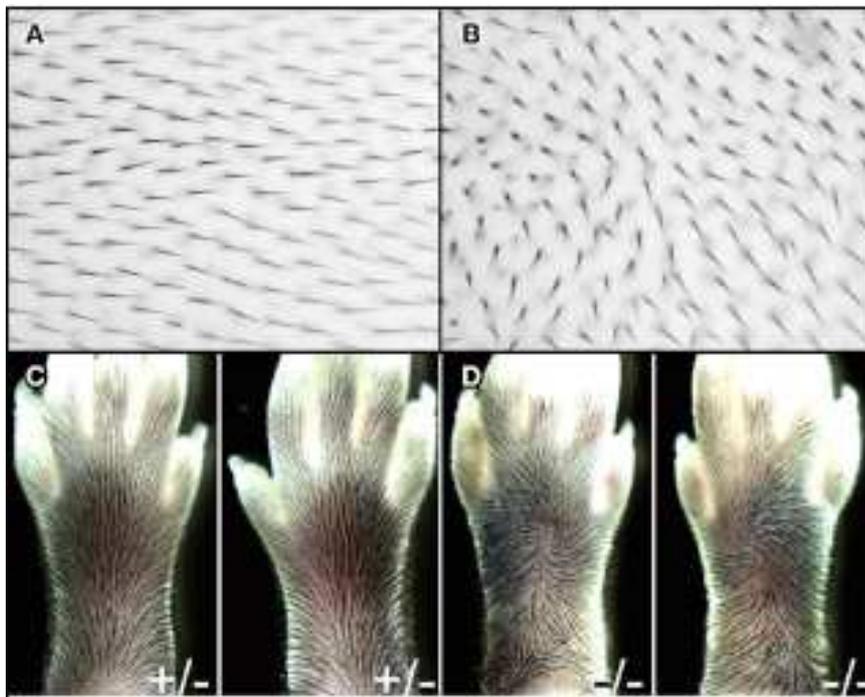


Figure 11: Implication de la voie PCP dans l'orientation des soies des ailes de drosophile (A/B) et des poils de souris (C/D)

(A/C) Phénotype sauvage. (B/D) Des mutations affectant la polarité planaire font que les soies ou les ommatidies (B) et les poils (D) seront orientées de manière aléatoire
D'après (Zallen 2007)

1. L'activation des petites GTPases Rho et Rac dans la voie PCP

La voie PCP est également induite par les récepteurs Fzd pour activer Dvl, mais ce signal est indépendant de l'activation du co-récepteur LRP5/6. Cependant, une étude plus récente a montré que LRP6 pouvait réguler les mouvements d'extension convergente lors de la gastrulation chez le xénope (Tahinci et al. 2007). La signalisation en aval ne fait pas non plus intervenir la GSK3 β , ni la β -caténine.

L'activation de Dvl via les domaines DEP et PDZ induit 2 voies parallèles impliquant les petites GTPases Rho et Rac (Wallingford et al. 2005). L'implication de ces GTPases dans la voie PCP a été démontrée chez les vertébrés lors de la gastrulation du xénope. En effet, Rho est une cible de la protéine Dvl (Strutt et al. 1997), et son activation nécessite la formation d'un complexe entre Dvl et la protéine Daam1 (Dishevelled associated activator morphogenesis 1). Parallèlement, l'importance de Rac a aussi été montrée dans la gastrulation après activation de certains récepteurs Fzd (rFz1, xFz7) par XWnt11 (Habas et al. 2003; Habas et al. 2001) (**Figure 12, 13**).

L'activation de Rho conduit ainsi à l'activation de la Rho-associated kinase (ROCK) (Marlow et al. 2002; Winter et al. 2001) et de la myosine (Weiser et al. 2007). L'activation de Rac induit plutôt l'activité de la kinase C-Jun (JNK) (Habas et al. 2003), mais les facteurs en aval dans la signalisation non canonique reste encore peu connus. Dans les 2 cas, les éléments du cytosquelette tels que l'actine et les microtubules sont modulés, amenant à un réarrangement du cytosquelette. Leur implication dans une régulation transcriptionnelle de gènes de la voie non canonique n'est pas encore établie.

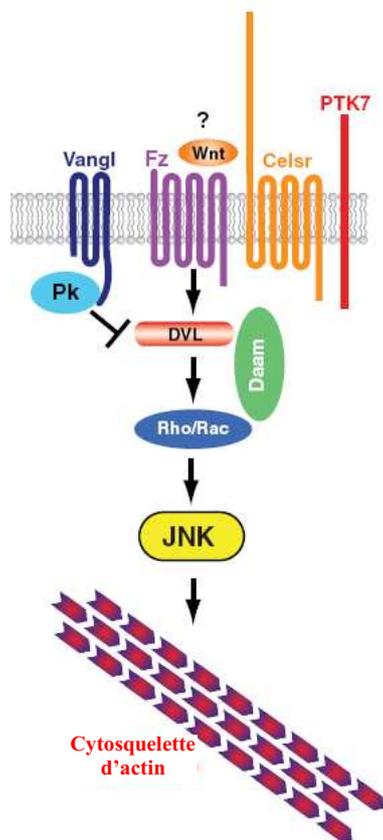


Figure 12: Voie de signalisation PCP
D'après (Montcouquiol et al. 2006)

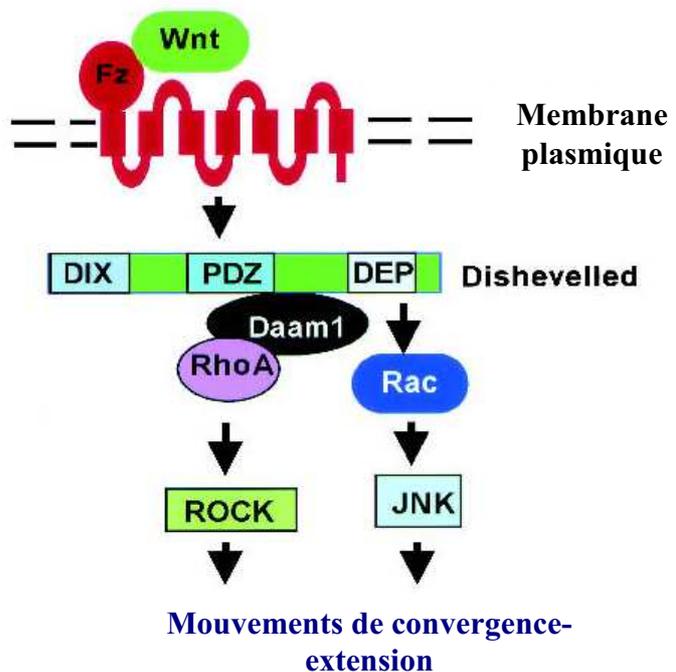


Figure 13: Modèle d'activation des protéines Rho et Rac dans la signalisation Wnt/Frizzled/Dishevelled
D'après (Habas et al. 2003)

2. Mécanismes d'activation de Dvl dans la voie PCP

La voie PCP implique aussi d'autres éléments de signalisation capables d'interagir avec Fzd et Dvl afin d'établir la polarité des cellules. Dans ce système, Dvl joue un rôle essentiel, et c'est son interaction avec ces nouveaux éléments de la voie PCP qui va permettre d'activer les petites GTPases (**Figure 13**).

a) Les multiples éléments de la voie PCP

Les éléments membranaires connus de la voie PCP sont Fzd, Flamingo (Fmi ou Stan) et Strabismus (Stbm ou Vang), et les facteurs cytosoliques associés à la membrane lors de la signalisation PCP sont Dvl, Diego (Dgo) et Prickle (Pk). Ces éléments constituent le corps de la voie PCP. Dans le **tableau 4** sont répertoriées les différentes interactions connues entre ces éléments de la PCP.

Gènes <i>Drosophila melanogaster</i>	Gènes des vertébrés	Dispositifs moléculaires	Tissus affectés	
			Drosophile	Vertébrés
Frizzled (Fzd)	Fzd3 (souris)	<ul style="list-style-type: none"> - Récepteur à 7 domaines transmembranaires : lie Wnt, Dvl - Recrute Dvl et Dgo à la membrane plasmique 	Tous les tissus adultes	Oreille interne, épiderme
	Fzd6 (souris)			Oreille interne, épiderme
	Fzd7 (xénope)			Extension convergente
Dishevelled (Dvl)	Dvl2 Xdsh (xénope)	<ul style="list-style-type: none"> - Protéine cytoplasmique (DIX, PDZ, DEP) : recruté à la membrane par Fzd - Lie Fzd, Pk, Stbm, Dgo - Nombreuses phosphorylations 	Tous les tissus adultes	Extension convergente, Oreille interne
Prickle (Pk)	Pk1/2 (poisson-zèbre)	<ul style="list-style-type: none"> - Protéine cytoplasmique (3 LIM, 1 PET) - Recruté à la membrane plasmique par Stbm - Interagit avec Dvl, Stbm, Dgo - En compétition avec Dgo pour se lier avec Dvl 	Tous les tissus adultes	Extension convergente
Strabismus (Stbm)/ Van Gogh (Vang)	Vangl2 (loop tail, souris) Trilobite (poisson-zèbre)	<ul style="list-style-type: none"> - Protéines à 4 domaines transmembranaires - Lie Pk, Dvl, Dgo - Recrute Pk à la membrane plasmique 	Tous les tissus adultes	Extension convergente, Oreille interne
Flamingo (Fmi)/ starry night (Stan)	Celsr1 (souris)	<ul style="list-style-type: none"> - Cadhérine avec récepteur à 7 domaines transmembranaires 	Tous les tissus adultes	Extension convergente, Oreille interne
Diego (Dgo)	Diversin (ou ankrd6) Inversin	<ul style="list-style-type: none"> - Protéine cytoplasmique (ankyrine) - Recruté à la membrane par Fzd - Lie Dvl, Stbm, Pk - En compétition avec Pk pour se lier avec Dvl 		Extension convergente
Non Déterminé	Protein tyrosine kinase 7 (Ptk7, Souris)	<ul style="list-style-type: none"> - Protéine transmembranaire - Peu d'informations sur son rôle dans PCP 		Oreille interne
	XPTK7 (xénope)			Extension convergente

Tableau 4 : Les différents éléments qui composent le corps de la PCP
D'après (Seifert et al. 2007)

b) Mécanismes moléculaires et cellulaires de la voie PCP

Plusieurs modèles d'interactions moléculaires commencent à être proposés lors de la mise en place de la voie PCP.

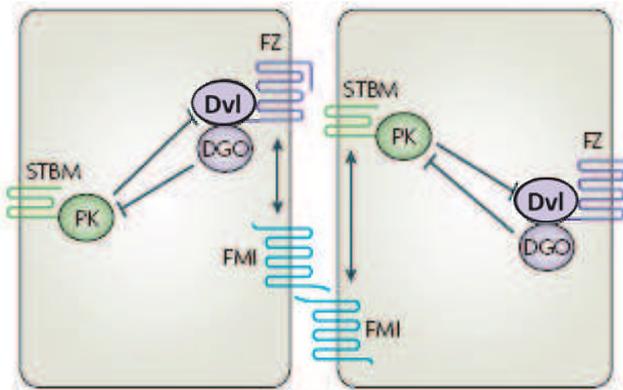


Figure 14: Modèle d'interactions moléculaires entre les différents éléments de la voie PCP

D'après (Seifert et al. 2007)

En effet, un modèle d'interactions moléculaires entre les éléments de la voie PCP a été proposé pour différents organismes tels que le xénope ou la drosophile (**Figure 14**). Fzd peut interagir avec le domaine PDZ de Dvl, formant un complexe Fzd-Dvl à la membrane de la cellule (Wong et al. 2003). Pk et Stbm forment un autre complexe à la membrane puisque le recrutement membranaire de Pk requiert Stbm (Jenny et al. 2003). Cependant, Pk peut aussi interagir avec Dvl, et causer une diminution de la localisation membranaire de Dvl. Ceci indique qu'*in vivo*, de forte concentration de Pk inhibe Dvl, amenant à un effet inhibiteur de Pk sur la voie PCP.

Dgo, en se liant physiquement à Dvl, forme un complexe Fzd-Dvl-Dgo et régule positivement la signalisation PCP. Lié à Dvl, Dgo se retrouve en compétition avec Pk, et antagonise l'effet inhibiteur de Pk sur la voie PCP (Jenny et al. 2005). Enfin, des évidences génétiques placent Fmi dans les deux complexes, même s'il n'y a aucune donnée biochimique qui confirmerait des interactions physiques.

La voie PCP dépend donc d'interactions complexes entre les différents éléments de la voie, amenant à une distribution spécifique de chaque élément, nécessaire et indispensable à la polarité.

c) Localisation subcellulaire des éléments de la voie PCP

Dans chaque cellule, la localisation subcellulaire bien spécifique des éléments de la voie PCP serait également nécessaire à l'activation de la voie. Chez la drosophile, un modèle de polarité moléculaire a été proposé dans l'orientation des soies des ailes (Zallen 2007). Ce modèle met

en jeu une distribution asymétrique des éléments du corps de la voie PCP (**Figure 15**). En effet, dans chaque cellule, avant le début de la signalisation PCP, tous les composants se localisent dans le cytoplasme (A). Puis, Fzd et Stbm sont recrutés à la surface apicale par Fmg, et recrutent Dvl et Pk, respectivement (B). Deux complexes de protéines, Fzd-Dvl et Stbm-Pk, se retrouvent respectivement localisés aux pôles distal et proximal de la cellule (C). Une fois à la surface, l'activité des composants du corps de la PCP est requise pour achever la polarité planaire.

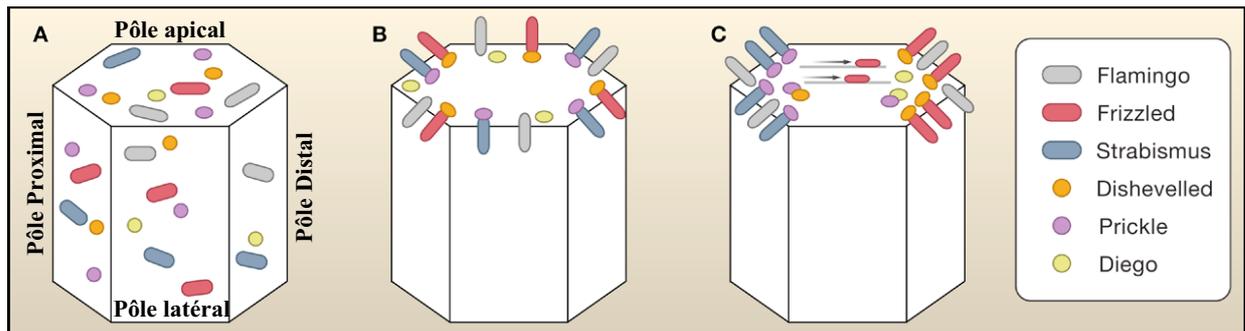


Figure 15: Modèle de distribution asymétrique des éléments du corps de la voie PCP dans l'orientation des soies des ailes de drosophile
D'après (Zallen 2007)

La polarité apicale dépendrait donc de la présence des protéines transmembranaires Fzd, Stbm et Fmi au pôle apical. Chaque mutant présente une localisation apicale de ces éléments fortement altérée (Bastock et al. 2003; Das et al. 2004; Tree et al. 2002). Ainsi, le recrutement et la maintenance des facteurs de la voie PCP au côté apical reflètent la première étape de la signalisation, et l'asymétrie des protéines joue un grand rôle dans le développement de la polarité planaire cellulaire (Montcouquiol et al. 2006).

La présence de Fzd dans les cellules ne suffit pas non plus à une orientation cellulaire correcte. Certaines observations ont aussi mené à un modèle d'action dans lequel un gradient de Fzd déterminerait la direction de la polarité planaire des soies des ailes de drosophile (Adler et al. 1997; Lawrence et al. 2004; Zheng et al. 1995). Dans la **figure 16A**, ce gradient de l'activité de Fzd (en bleu) est maintenu par un mécanisme dans lequel l'activité de Fzd est évaluée dans la cellule par rapport à celle des cellules voisines. Lorsque Fzd est muté (les 2 cellules centrales dans la **Figure 16B**), ce processus induit les cellules avoisinantes normales à réduire l'activité de Fzd, causant une réorientation inversée des poils.

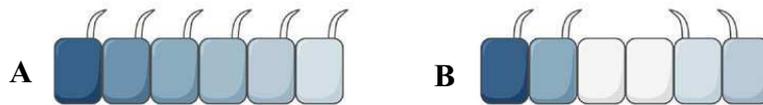


Figure 16: Modèle où un gradient de Fzd induit la direction de la polarité planaire chez la Drosophile

D'après (Zallen 2007)

Chez la drosophile, la polarisation nécessite une localisation subcellulaire bien spécifique des différents composants de la PCP ainsi que des interactions complexes entre ces différents éléments.

B. La voie non canonique Wnt/Ca²⁺

La seconde branche de la voie Wnt non canonique est la voie Wnt/Ca²⁺. Il est possible que cette voie et la voie PCP ne soient pas complètement mécanistiquement distinctes. En effet, la voie Wnt/Ca²⁺ partage de nombreux composants avec la PCP, et la surexpression de Wnt5a, Wnt4 ou Wnt11 peut entraîner des altérations au niveau de l'extension convergente avec une augmentation de Ca²⁺ intracellulaire relargué (Kohn et al. 2005) (**Figure 17**).

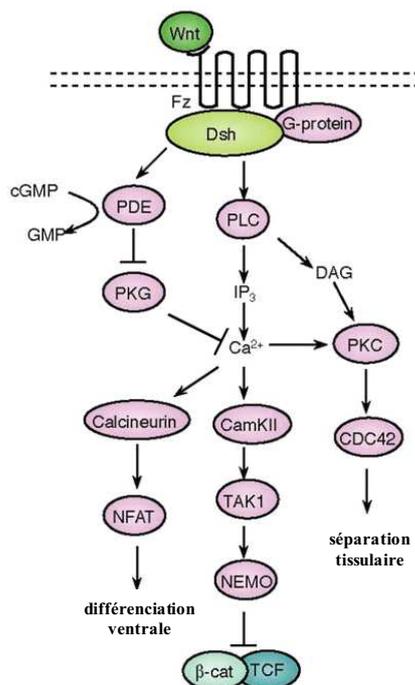


Figure 17: Représentation schématique de la cascade de transduction de la voie Wnt/Ca²⁺
D'après (Komiya et al. 2008)

La première indication de l'existence d'une voie Wnt faisant intervenir le Ca²⁺ a été observée dans une étude où la surexpression de Wnt5a dans des oocytes de xénope induisait une augmentation de Ca²⁺ intracellulaire, sans affecter la stabilisation de la β-caténine et

dépendant des protéines G (Slusarski et al. 1997). En effet, dans cette voie, la signalisation Wnt/Fzd induit un relargage de Ca^{2+} intracellulaire à travers les petites protéines G trimériques. L'activation de Dvl par ces protéines G induit d'une part, l'activation de l'inositol-4, 5-biphosphate (IP3) par la phospholipase C (PLC) et d'autre part, l'inhibition de la protéine kinase G (PKG) par la phosphodiesterase PDE. L'IP3 et la PKG inhibée créent un relargage de Ca^{2+} dans la cellule. En retour, ce Ca^{2+} intracellulaire active 3 enzymes, la calcium/calmoduline kinase II (CamKII), la phosphatase calcineurine (Kuhl et al. 2000) et la protéine kinase C (PKC) (Sheldahl et al. 2003) (**Figure 17**).

Il a été montré que la CAMKII pouvait activer les kinases TAK (TGF β activated kinase) et NLK (Namo-like kinase) qui inhibaient la signalisation de la β -caténine/TCF pour réguler négativement la formation de l'axe dorsal (Ishitani et al. 1999).

L'action de la calcineurine, elle, stimule le facteur de transcription NFAT, et donc participe à la différenciation ventrale des cellules.

La PKC, sensible au Ca^{2+} intracellulaire relargué, est aussi stimulée par la production de diacylglycerol (DAG). Elle régule ainsi les processus de séparation tissulaire et les mouvements cellulaires lors de la gastrulation via l'activation de la GTPase cdc42 (Sheldahl et al. 2003; Winklbauer et al. 2001).

Le rôle de la voie Wnt/ Ca^{2+} durant l'embryogénèse est divers. Elle implique une régulation négative de la voie canonique pour la formation de l'axe dorsal, et la modulation de la signalisation PCP pour la différenciation ventrale, les mouvements cellulaires lors de la gastrulation et la formation cardiaque à des stades tardifs. Cette voie Wnt dépendante du Ca^{2+} est donc un modulateur critique de la voie canonique et de la polarité planaire. Il serait important de comprendre comment fonctionne cette voie au niveau moléculaire pour pouvoir réguler les effets biologiques des 2 voies Wnt/Fzd.

IV. Modulateurs extracellulaires

Les voies de signalisation Wnt/Fzd sont contrôlées par un grand nombre de modulateurs extracellulaires qui se lient soit sur les Wnt directement, soit sur les récepteurs des Wnt. Ils peuvent agir ainsi en tant qu'antagonistes (sFRP, WIF, DKK, SOST) ou en tant qu'agonistes (Norrin, R-spondin) (MacDonald et al. 2009) (**Figure 18**).

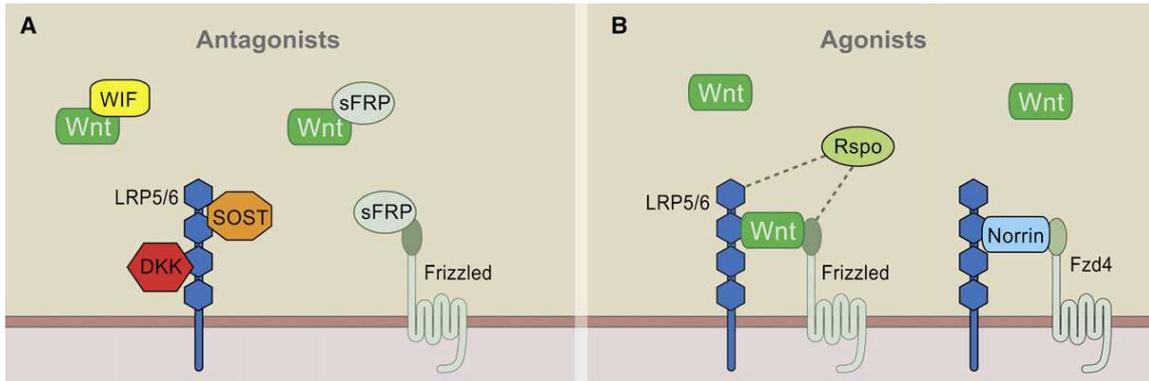


Figure 18: Les agonistes et antagonistes sécrétés du système Wnt
D'après (MacDonald et al. 2009)

Ces régulateurs sécrétés jouent des rôles majeurs dans l'embryogenèse et sont largement impliqués dans certains processus physiologiques et pathologiques (Jones et al. 2002; Kawano et al. 2003).

A. Antagonistes de Wnt

1. Secreted Frizzled Related Proteins (sFRP)

Les sFRP représentent les médiateurs extracellulaires les plus puissants du système Wnt et sont les régulateurs les mieux étudiés (Rattner et al. 1997). Ils peuvent lier les Wnt et agir ainsi en tant que modulateur de la signalisation Wnt. Le génome humain comporte 5 gènes *sFRP* dont les orthologues ont été identifiés chez plusieurs vertébrés, et il existe en tout 8 membres dans cette famille. La nomenclature actuelle s'accorde pour utiliser les termes *sFRP1, 2, 3 (ou FrzB), 4, 5*.

Au cours des années, le laboratoire s'est plus particulièrement intéressé à sFRP1, ou FrzA (Duplaa et al. 1999). Son implication dans l'angiogenèse a fait l'objet d'une partie annexe de ma thèse, et sera plus détaillée dans la partie « Implication du système Wnt/Fzd au niveau vasculaire », ainsi que dans la partie « résultats ».

a) Structure et fonction des sFRP

Les gènes codant pour les protéines sFRP sont situés sur des chromosomes différents et sont aussi séparés des gènes *fzd*.

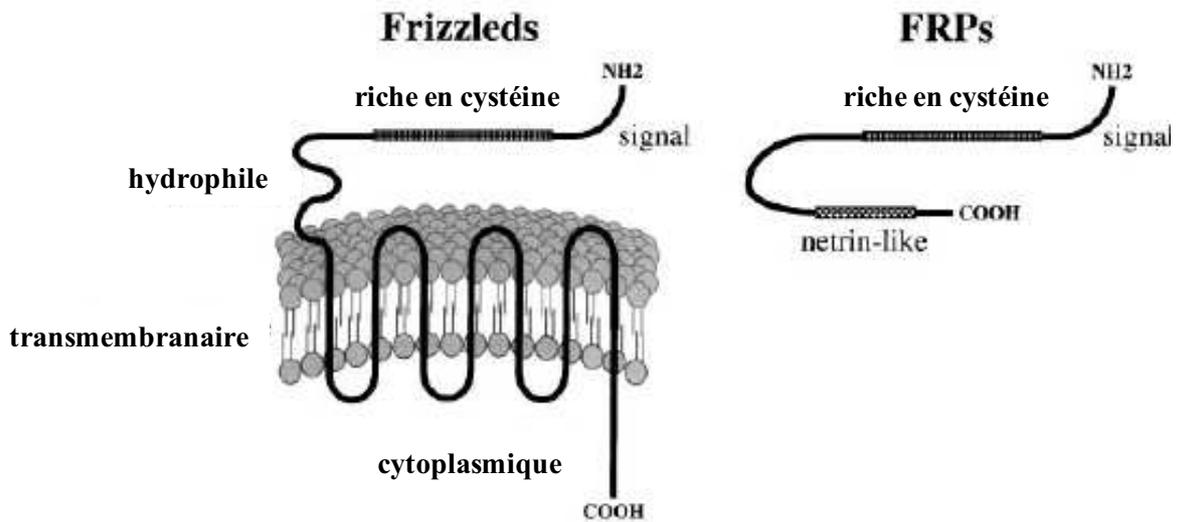


Figure 19: Structure des sFRP en comparaison avec la structure prédictive d'un récepteur Frizzled

D'après (Wodarz et al. 1998).

Les protéines sFRP comportent approximativement 300 aa et possèdent en N-terminal un peptide signal suivi de 2 domaines structuraux : le domaine CRD (Cystein Rich Domain) et un domaine NTR (« Netrin-like ») (**Figure 19**).

En N-terminal, le domaine CRD inclut 10 cystéines conservées et partage 30-50% d'homologie de séquence avec ceux des récepteurs Fzd (Melkonyan et al. 1997). Les cystéines conservées s'associent en ponts disulfures permettant d'acquérir pour ce domaine une structure tridimensionnelle spécifique (Chong et al. 2002; Dann et al. 2001). Dans les sFRP, des données contradictoires indiquent que le domaine CRD est (Lin et al. 1997) ou n'est pas (Uren et al. 2000) nécessaire pour l'interaction fonctionnelle avec les Wnt, et son rôle dans sa liaison avec le ligand Wnt reste encore peu connu (Kawano et al. 2003).

Sur la base de l'organisation structurale de ce domaine CRD, les sFRP peuvent être séparés en 2 groupes distincts : FrzB et sFRP4 d'un côté et sFRP1, 2, et 5 de l'autre.

Bien que les sFRP soient sécrétés, il apparaît qu'ils sont liés à la membrane plasmique et/ou à la MEC. Tout comme certains Wnt, sFRP1 est relargué dans le milieu de culture après addition d'héparine. L'association de sFRP avec les protéoglycanes héparane sulfates pourraient stabiliser son interaction avec les Wnt ou bien déterminer la localisation de son action. Cette association pourrait se faire via le domaine NTR (Uren et al. 2000).

b) Mécanisme de régulation du système Wnt/Fzd

Les données initiales indiquant que les sFRP antagonisent l'activité Wnt proviennent de travaux effectués chez le xénope. La coinjection des ARNm de sFRP1 avec XWnt au stade blastula bloque la formation ectopique d'un second axe (Finch et al. 1997). Des expériences de coculture de cellules mammifères indiquent que sFRP1 antagonise Wnt1 (Dennis et al. 1999) et la protéine purifiée sFRP1 inhibe la signalisation Wnt (Uren et al. 2000).

Les différents sFRP ont des spécificités diverses vis-à-vis des Wnt. Par exemple, sFRP1 inhibent la signalisation induite par Wnt1, 2 ou 8 mais pas celle induite par Wnt3a, 5a ou 11 (Bafico et al. 1999; Finch et al. 1997; Jaspard et al. 2000; Wang et al. 1997; Xu et al. 1998).

L'ensemble de ces données suggère que les sFRP se lient de façon spécifique à certains Wnt pour empêcher la liaison à leurs récepteurs. Cependant, un mécanisme alternatif d'action des sFRP peut être envisagé dans la mesure où il a été montré que les domaines CRD des sFRP peuvent former des dimères avec les domaines CRD des récepteurs Fzd (Bafico et al. 1999; Dann et al. 2001). Cette formation d'hétéroduplexes entre les récepteurs Fzd et les sFRP constitue un autre mode d'action par lequel les sFRP peuvent inhiber le système Wnt/Fzd.

2. Wnt inhibitory protein, Dickkopf et WISE/SOST

Wnt inhibitory protein (WIF) est également un antagoniste à la fois de la voie canonique et non canonique (Bovolenta et al. 2008). Bien que cette protéine ne comporte aucun domaine CRD, elle est capable de se lier aux Wnt via un domaine WIF qu'on retrouve en N-terminal. Ainsi, l'injection de l'ARNm WIF1 dans les embryons de xénope induit une perturbation de la somitogenèse et exerce un rôle inhibiteur sur la signalisation Wnt/Fzd en se liant à XWnt8 (Hsieh et al. 1999).

Parmi les autres régulateurs extracellulaires du système Wnt/Fzd, les membres de la famille Dickkopf (Dkk) et WISE/SOST sont des antagonistes spécifiques de la signalisation canonique.

Composée de 4 membres (Dkk1-4), la famille Dkk se distingue par son mode de fonctionnement car elle inhibe spécifiquement la signalisation Wnt/ β -caténine (Krupnik et al. 1999), non pas par une interaction avec les Wnt, mais en se liant aux co-récepteurs LRP5/6 (Bafico et al. 2001; Mao et al. 2001). Deux types de mécanismes d'inhibition de la voie β -caténine ont été proposés. Dkk1 peut empêcher la formation du complexe Fzd-LRP6 (Semenov et al. 2001). L'autre mécanisme est indirect et passe par l'interaction de Dkk1 avec un récepteur Kremen (Mao et al. 2002). La formation d'un complexe ternaire avec LRP6

induit une internalisation par endocytose de ce récepteur LRP. Or, le système LRP5/6 permet le recrutement de l'axine et sa dégradation. Ainsi, en inhibant le système LRP5/6, le système Dkk1/Kremen protège l'axine de sa dégradation et peut continuer de jouer un rôle inhibiteur sur la voie canonique en favorisant la dégradation de la β -caténine. A ce jour, les protéines de la famille Kremen sont identifiées comme seconde classe de la famille Dkk (Niehrs 2006). Pour autant, Dkk1 n'inhibe pas la voie PCP (Semenov et al. 2001) mais au contraire l'active (Pandur et al. 2002).

WISE et SOST constituent une autre famille antagoniste qui se lie à LRP5/6 (Itasaki et al. 2003; Li et al. 2005; Semenov et al. 2005). Comme Dkk1, SOST est capable *in vitro* d'empêcher la formation du complexe Fzd/LRP6 induit par Wnt.

B. Agonistes de Wnt

Les protéines Norrin et R-spondin (Rspo) sont deux familles agonistes de la signalisation Wnt/ β -caténine.

Norrin est un ligand spécifique du récepteur Fzd4, qui agit à travers Fzd4 et LRP5/6 durant la vascularisation de la rétine (Xu et al. 2004). Son implication dans ce processus sera plus détaillée dans la partie « Implication du système Wnt/Fzd au niveau vasculaire ».

Le ligand Rspo synergise avec Wnt, Fzd et LRP6 dans l'activation de la voie canonique, mais son mécanisme d'action reste controversé. Certaines études montrent que Rspo lie à la fois Fzd et LRP6 (Nam et al. 2006). Un autre modèle suggère que Rspo est un ligand de Kremen et antagonise l'internalisation de LRP6 induite par Dkk/Kremen (Binnerts et al. 2007).

V. Implication de Frizzled 4 et Dishevelled 3 dans l'activation des voies de signalisation

Comme décrit ci-dessus, la voie Wnt/Fzd est complexe du fait des différentes voies activées, mais aussi du fait de la présence de plus de 19 facteurs Wnt capables de se fixer sur 10 récepteurs Fzd différents. Actuellement, beaucoup d'informations sont disponibles sur les différents acteurs du système Wnt/Fzd, mais on ne trouve pas dans la littérature de couples Wnt/Fzd spécifiques.

A. Frizzled4

Au cours de ma thèse, je me suis plus particulièrement intéressée à l'étude du récepteur Fzd4. Celui-ci semble être impliqué dans les deux voies de signalisation Wnt, même

si la plupart des études l'ont associé à la voie canonique, et ce, à travers plusieurs familles de ligands. Sous Wnt3a, Fzd4 induit la signalisation β -caténine dépendante. Cette activation semble être inhibée par la dégradation de Dvl induite par inhibition de l'endocytose (Bryja et al. 2007). Chez le xénope, XWnt8 fusionnée à LRP6 synergise avec Fzd4 pour transactiver la voie β -caténine dépendante (Holmen et al. 2005). Norrin, une autre classe de ligand, induit également l'activation de la voie canonique de façon dépendante de Fzd4 et de LRP (Xu et al. 2004). Un défaut dans cette association ligand-récepteur est associé à une maladie héréditaire, la vitréorétinopathie exsudative familiale, que l'on décrira dans la partie « Implication du système Wnt/Fzd au niveau vasculaire ». Cependant, malgré ces données, l'activation de la voie canonique par Fzd4 révèle quelques incompréhensions puisqu'une étude a montré que le récepteur Fzd4 délété de sa partie transmembranaire et de son domaine intracellulaire pouvait quand même activer la signalisation β -caténine sous XWnt8 chez le xénope (Swain et al. 2005).

Fzd4 peut aussi induire la voie de polarité planaire cellulaire (Yu et al. 2007), qui nécessite l'internalisation du récepteur Fzd4 via une interaction entre l'isoforme Dvl2 et la protéine adaptatrice AP-2 impliqué dans le trafic d'endocytose. L'internalisation de Fzd4 est réalisée sous l'activation du ligand Wnt5a (Chen et al. 2003). Cependant, le rôle de Fzd4 dans la voie PCP est encore peu connu et la majorité des études impliquent les récepteurs Fzd 3, 6 et 7 dans l'activation de cette voie chez la drosophile et les vertébrés (Djiane et al. 2000; Guo et al. 2004; Wang et al. 2006).

Enfin, l'injection de Fzd4 sauvage dans des embryons de xénope a révélé une activation des protéines CAMKII (calcium/calmodulin-dependent protein kinase II) et PKC (protein kinase C), composants de la voie Wnt/ Ca^{2+} (Robitaille et al. 2002).

La spécificité de l'activation de chaque voie doit donc résider notamment dans la spécificité d'interaction de Fzd4 avec ses partenaires extracellulaires et intracellulaires.

B. Dishevelled3

Comme on l'a vu précédemment, parmi les partenaires intracellulaires, la protéine Dvl joue un grand rôle dans la spécificité d'activation des différentes voies de signalisation. Les mammifères partagent 3 isoformes différents de Dvl, et bien que les rôles de Dvl1, Dvl2 et Dvl3 aient été décrits, les fonctions de Dvl3 restent encore mal comprises. Ainsi, au cours de ma thèse, je me suis aussi plus particulièrement intéressée à l'étude de l'isoforme Dvl3.

Il semble que les 3 isoformes de Dvl agissent de manière redondante. En effet, les souris invalidées pour *dvl1*, *dvl2* et *dvl3* présentent certaines similitudes au niveau de leur

phénotype, avec notamment des anomalies cardiaques suite à la délétion de *dl2* ou *dl3* (Etheridge et al. 2008; Hamblet et al. 2002; Lijam et al. 1997; Wang et al. 2006) (**Tableau 3**). Le rôle de Dvl3 dans l'activation des voies canonique et non canonique a été démontré. L'activation de la voie β -caténine par Wnt3a est dépendante notamment de la présence de Dvl3 (Lee et al. 2008). La délétion de *dl3* supprime la transduction du signal induite par Wnt3a. Un autre ligand, R-spondin, peut aussi activer la phosphorylation de Dvl3 (Wei et al. 2007). Ce dernier joue également un rôle dans la régulation négative de la voie canonique par le suppresseur de tumeur Disabled2 (Hocevar et al. 2003). Enfin, il peut activer la voie canonique par le biais de l'activation de Rac1 lors de la progression tumorale (Esufali et al. 2007).

Dans la voie PCP, il joue aussi un rôle important durant la neurulation et le développement de la cochlée (Etheridge et al. 2008). Sous Wnt3a, il induit la signalisation JNK en activant les GTPases RhoA, Rac1 et cdc42 ainsi que la cascade des kinases MEKK (Bikkavilli et al. 2008), et c'est le récepteur Fzd1 qui est mis en jeu dans ce modèle chez la drosophile. Dvl3 est aussi impliqué dans la croissance des neurites via Fzd3 et la signalisation JNK (Endo et al. 2008).

C. Données connues sur le partenariat entre Frizzled4 et Dishevelled3

Les protéines Dvl peuvent se lier à beaucoup de protéines différentes, cependant les interactions de l'isoforme Dvl3 notamment avec les récepteurs Fzd ont été très peu étudiées. Une seule étude aurait mis en jeu un partenariat potentiel entre Fzd4 et Dvl3 dans les cellules vasculaires. *In vitro*, Wnt5a induit la prolifération des HUVEC (Human umbilical vein endothelial cells) d'une manière non canonique, et met notamment en jeu la phosphorylation de Dvl3. Fzd4 semble être impliqué dans ce processus puisque sous l'activation de Wnt5a, le domaine CRD seul de Fzd4 bloque la croissance des HUVEC (Masckauchan et al. 2006). Cependant, dans cette étude, aucune interaction physique entre les deux partenaires n'a été montrée.

Au cours de ma thèse, j'ai abordé l'étude de la voie de signalisation induite par Fzd4 via Dvl3 dans les cellules vasculaires, et de la compréhension des mécanismes mis en jeu lors de son activation par la recherche de partenaires intracellulaires de Dvl3.

Chapitre II Morphogenèse de l'arbre vasculaire

Dans le cadre de ma thèse où j'ai étudié l'implication du système Wnt/Fzd dans la formation des vaisseaux, il m'a paru essentiel de décrire le développement de l'appareil vasculaire afin de comprendre les mécanismes connus dans ce processus et afin de replacer la voie Wnt dans ces mécanismes de morphogenèse vasculaire. Dans ce chapitre, je développerai plus particulièrement le mécanisme de l'angiogenèse ainsi que le développement des ramifications du réseau artériel, et présenterai les principaux facteurs impliqués dans ce processus.

I. Présentation générale

La formation de l'arbre vasculaire peut être schématiquement résumée en 3 processus majeurs :

La **VASCULOGENESE** consiste en la formation d'un plexus vasculaire primitif, peu organisé, à partir de précurseurs endothéliaux appelés angioblastes.

L'**ANGIOGENESE** permet la croissance, l'organisation et le remodelage du réseau vasculaire primitif préexistant, par bourgeonnement des capillaires, afin de rendre ce réseau fonctionnel.

Enfin, l'**ARTERIOGENESE** permet la maturation du réseau vasculaire par un recrutement de cellules musculaires lisses autour des tubes endothéliaux (myogenèse vasculaire).

L'angiogenèse est un processus complexe, variable d'un organe à un autre, qui nécessite une fine régulation, faisant intervenir différents types cellulaires, vasculaires (cellules endothéliales (CE), cellules musculaires lisses (CML)) ou non (cellules inflammatoires, fibroblastes), mais aussi de nombreux composants de la matrice extracellulaire (MEC). Elle résulte de la balance entre l'action de facteurs anti- ou pro-angiogéniques. Un dérèglement dans cette balance a généralement un impact très important sur la santé et contribue à l'apparition de diverses pathologies. Ainsi, la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans ce processus est un enjeu majeur en terme thérapeutique. Cela est vrai tant pour les pathologies cancéreuses où il y a nécessité de bloquer la néovascularisation qui permet la croissance tumorale (Folkman 1995), que pour les pathologies cardiovasculaires où il faut revasculariser un tissu ischémique comme le myocarde ou les muscles des membres inférieurs (Takeshita et al. 1994).

Nous décrirons dans un premier temps l'organisation du système vasculaire et les différents types de vaisseaux afin de déterminer le contexte cellulaire et matriciel de la formation de l'arbre vasculaire.

Dans un second temps, nous aborderons les mécanismes cellulaires fondamentaux mis en jeu dans la morphogenèse vasculaire, et plus précisément lors de l'angiogenèse bourgeonnante en condition physiologique.

II. Organisation générale du système vasculaire

Le système vasculaire permet de distribuer dans tous les tissus le sang qui transporte toutes les molécules nécessaires au bon fonctionnement des cellules (oxygène, glucose...), et d'éliminer les déchets en les transportant au niveau des reins ou des poumons, par exemple. On peut distinguer dans le système vasculaire le réseau artériel qui part du cœur vers les organes, et le réseau veineux qui ramène le sang au cœur. La répartition du sang dans l'organisme impose une structure allant des plus gros vaisseaux aux vaisseaux les plus fins. Au contraire, pour ramener le sang au cœur, le système veineux rassemble une multitude de petits vaisseaux afin de former les grosses veines. Dans l'arbre vasculaire, on distingue les vaisseaux de gros calibre (artère, veine), et ceux de calibre moyen ou petit (artériole, veinule, veinule post-capillaire et capillaire).

A. Les vaisseaux de gros calibre

La paroi des vaisseaux de gros calibre est composée de trois tuniques concentriques distinctes qui sont, de l'intérieur vers l'extérieur, appelées : intima, média et adventice. Elles sont séparées par deux couches appelées limitantes élastiques interne et externe (LEI et LEE) (**Figure 20**).

L'intima est la tunique la plus interne du vaisseau, en contact direct avec le sang. Elle est composée de tissu endothélial reposant sur une membrane basale bordée en profondeur par la LEI. L'endothélium se compose de CE jointives formant une couche continue entre la lumière du vaisseau et sa paroi. La membrane basale, synthétisée par les CE, est composée essentiellement de collagène de type IV, de glycoprotéines de structure (ex : laminine) et de protéoglycanes (ex : perlécan). Enfin, la LEI est une couche perméable de tissu élastique rendant possible l'échange de molécules, voire de cellules, entre l'intima et la média.

La média est la tunique la plus épaisse de la paroi artérielle. Elle contient plusieurs lames élastiques concentriques d'environ 3 à 8 μm d'épaisseur entre lesquelles se trouvent des CML, des fibres de collagène, de l'élastine et des protéoglycanes. Par leurs propriétés contractiles, les CML assurent le tonus vasculaire. Il existe au sein de la média deux types

différents de MEC : la lame basale qui entoure les CML (composée de collagène de type IV, laminine, de nidogène et de protéoglycanes) et la matrice interstitielle dans laquelle « baignent » les CML et leur lame basale (composée de collagènes fibrillaires, fibronectine, vitronectine, et thrombospondine). L'ensemble de ces protéines matricielles et fibres élastiques est synthétisé par les CML. La média est séparée de l'adventice par la LEE. L'adventice est la tunique externe protectrice composée de CML, de fibroblastes, de fibres élastiques, de collagène ainsi que de protéoglycanes. Elle sert de support aux vaisseaux sanguins nourriciers de la paroi vasculaire (vasa vasorum), aux vaisseaux lymphatiques et au système nerveux chargé de l'innervation des CML de la couche externe de la média.

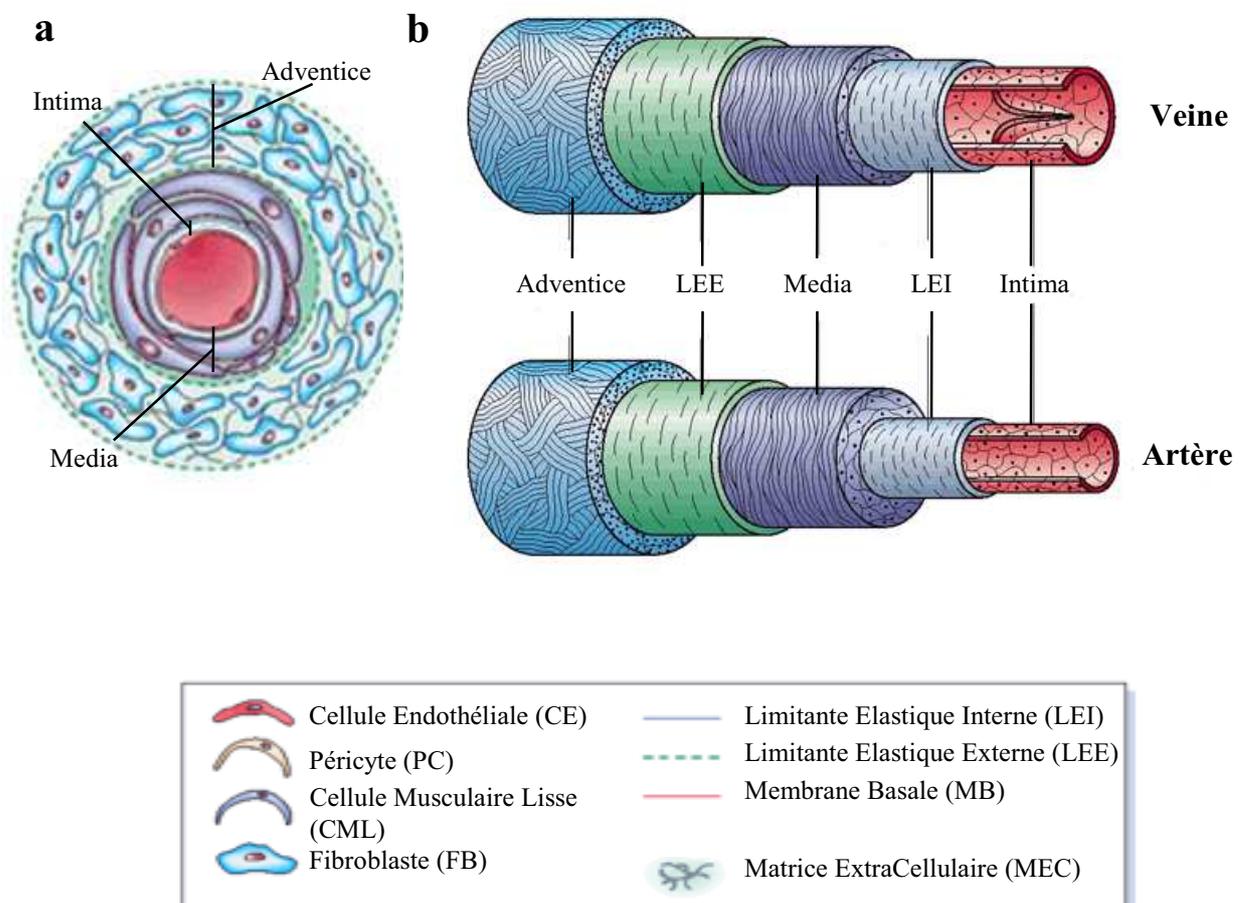


Figure 20 : Représentation schématique de la paroi des vaisseaux de gros calibre en coupe transversale (a) et en vue « éclatée » (b)

Cette paroi comporte trois couches tissulaires avec, de l'intérieur vers l'extérieur : l'intima, composée de CE ; la média composée de CML ; l'adventice composée de fibroblastes. Ces tuniques sont entourées de MEC et séparées par des couches de fibres élastiques. L'adventice possède son propre apport sanguin (vasa vasorum) qui émet des projections dans la partie externe de la média. Les CML et les limitantes élastiques contribuent au tonus vasculaire en étant responsable du contrôle du diamètre des vaisseaux et du flux sanguin.

D'après (Jain 2003) (Cleaver et al. 2003).

Il existe deux types d'artères : les artères élastiques, de 1 à 2 cm de diamètre, dont la fonction est de conduire le sang vers les grands territoires. Il s'agit de l'aorte, des artères pulmonaires, du tronc brachio-céphalique, des carotides primitives, des iliaques primitives. Les artères musculaires, de 1 mm à 1 cm de diamètre, beaucoup moins élastiques, contiennent comparativement une plus grande proportion de CML. Leur fonction est de distribuer le sang sur site. Il s'agit des artères des membres et des viscères, des artères cérébrales et des artères coronaires.

Les veines sont similaires structurellement aux artères, mais elles ont une paroi plus mince par rapport à leur diamètre (1 à 3 cm), et contiennent plus de tissu conjonctif que de tissu musculaire : elles sont donc plus extensibles que les artères. Contrairement aux autres vaisseaux, elles possèdent des valves anti-reflux qui permettent au sang de ne circuler que dans un seul sens : des organes vers le cœur.

B. Les vaisseaux de moyen et petit calibre

Les artères se divisent pour former différentes artérioles qui sont des vaisseaux importants dans la régulation de la pression artérielle. Elles ont un diamètre plus petit que les artères (quelques dizaines de μm), mais ont une composition relativement semblable à celle des artères musculaires. Ce sont les plus petites artérioles qui déversent leur contenu dans le réseau capillaire (**Figure 21 b et c**).

Les capillaires sont de très fins vaisseaux d'environ 5 à 8 μm de diamètre, constitués uniquement d'une couche de CE avec une lame basale et quelques fibres de collagène. Les capillaires ne possèdent pas de CML, mais on peut trouver de façon éparse quelques cellules de soutien, appelées péricytes, à la périphérie de la lame basale (**Figure 21 a et c**).

C'est au niveau des capillaires que vont se faire tous les échanges entre le sang et les tissus vascularisés. Les capillaires assurent aussi le lien entre le système artériel et veineux.

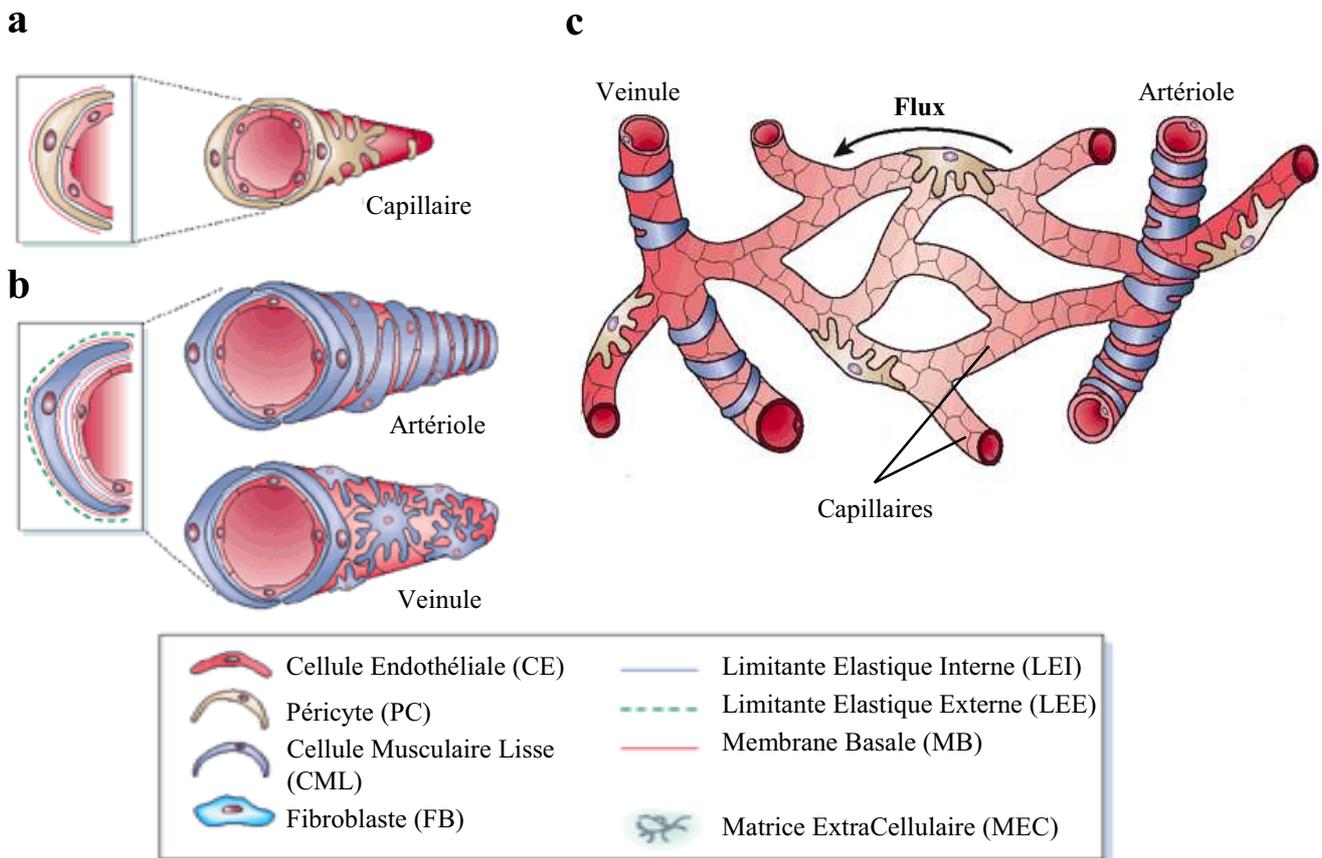


Figure 21 : Représentation schématique de la paroi des vaisseaux de petit (a) et moyen (b) calibre en coupe transversale et au niveau de la jonction artériole / veinule (c)

(a) Les capillaires, les vaisseaux sanguins les plus abondants de notre corps, sont composés de CE et d'une couche épaisse de péricytes entourés d'une membrane basale. Selon l'organe ou le tissu, l'endothélium des capillaires peut être continu, fenêtré ou discontinu. (b) Les artérioles et les veinules sont plus recouvertes de CML que les capillaires, qui sont très resserrées au niveau des artérioles. (c) Les capillaires assurent le lien entre le système artériel et veineux. D'après (Jain 2003) (Cleaver et al. 2003).

C. Mécanismes cellulaires de la morphogénèse vasculaire

La morphogénèse vasculaire se déroule autour de 3 grands processus : la vasculogénèse, l'angiogénèse et l'artériogénèse. Nous allons décrire les mécanismes cellulaires de formation des vaisseaux par ces trois processus.

1. La vasculogénèse

La vasculogénèse consiste en la formation d'un réseau vasculaire primitif lors du développement embryonnaire. Ce sont les cellules précurseurs, appelées hémangioblastes et angioblastes qui sont à l'origine des CE. Elles dérivent principalement du mésoderme postérieur et latéral (**Figure 22**), et certains de leurs marqueurs sont connus : CD31, CD34 et le récepteur de type 2 du VEGF (VEGFR-2 ou flk-1).

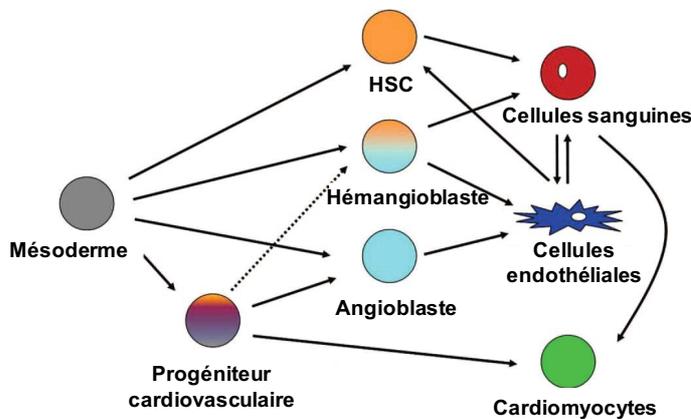


Figure 22 : Origine des cellules endothéliales
D'après (Jin et al. 2009)

Les mécanismes moléculaires concourant à cette différenciation ne sont pas tous définis mais certains gènes ont été identifiés (*Ets*, *Hex*, *VE-statine*, *Hox*, *Scl*, *Runx-1*). La différenciation des angioblastes et la formation du réseau vasculaire primitif dépendent notamment du VEGF et de son récepteur flk-1, dont l'inactivation du gène chez la souris engendre une mortalité embryonnaire due à un blocage précoce de l'hématopoïèse ainsi qu'un arrêt de la différenciation endothéliale (Shalaby et al. 1995). Les angioblastes se différencient aussi à partir de cellules totipotentes sous l'action du basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) (Krah et al. 1994), montrant que ce facteur est important dans ce processus. Enfin, les intégrines assurant les interactions CE/MEC sont aussi impliquées dans la différenciation de ces précurseurs (Bader et al. 1998).

C'est à partir de ces précurseurs endothéliaux que se formeront l'aorte dorsale, les veines cardinales et le système artério-veineux de l'embryon. D'autres voies de signalisation sont impliquées, incluant les systèmes Wnt/Fzd, Delta/Notch, Ephrine/Eph, ainsi que les voies du TGF- β et du PDGF.

2. L'angiogénèse

Le processus d'angiogénèse se déroule selon plusieurs étapes qui sont représentées schématiquement au niveau de la **figure 23** :

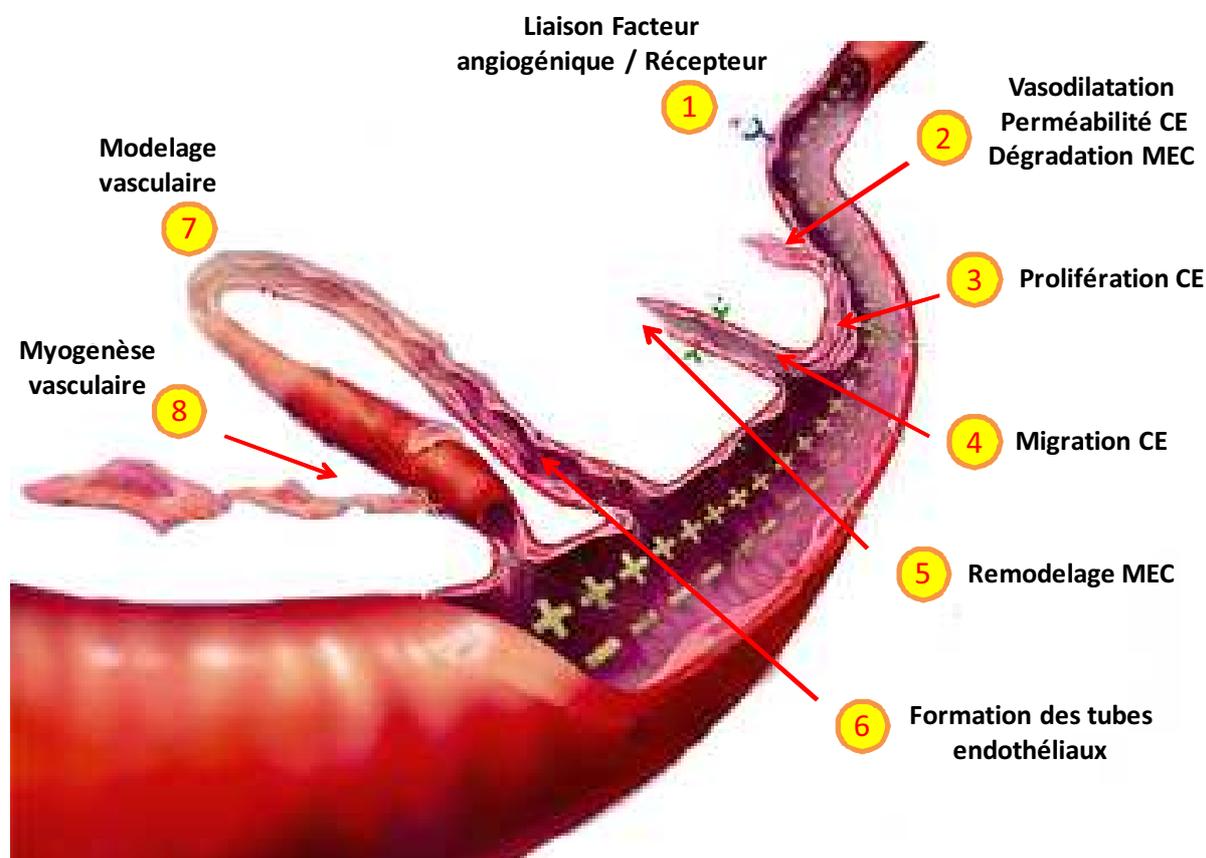


Figure 23 : Les grandes étapes de l'angiogénèse

1- Des facteurs angiogéniques se lient à des récepteurs spécifiques situés à la surface des CE : les CE sont activées **2-** Au site de bourgeonnement, les vaisseaux se perméabilisent. Des enzymes dégradent la membrane basale et la MEC entourant les vaisseaux. **3/4-** Les CE prolifèrent et migrent via les ouvertures créées dans la membrane basale. **5-** La matrice se reconstitue le long du vaisseau en cours d'élongation. **6-** Le tube endothélial se forme (lumière). **7-** Le néo vaisseau se modélise pour devenir fonctionnel. **8-** La structure du néo vaisseau se stabilise par recrutement de CML.

D'après une illustration de « Angiogenesis Foundation ».

<http://angio.org/understanding/understanding.html>

a) Vasodilatation, perméabilité vasculaire et dégradation de la MEC

La vasodilatation est un prérequis à la migration des CE et au bourgeonnement des vaisseaux. Elle est dépendante du monoxyde d'azote (NO) qui induit fortement la transcription du gène *VEGF*. Celui-ci, fortement stimulé par l'hypoxie, augmente ensuite la perméabilité vasculaire en relocalisant les molécules d'adhésion intercellulaires (PECAM-1 pour platelet endothelial cell adhesion molecule-1 et VE-cadhérine pour Vascular Endothelial-cadhérine) et en altérant

la structure des membranes cellulaires. (Eliceiri et al. 1999; Gale et al. 1999). Ceci permet une extravasation de protéines plasmatiques favorisant la survie des CE, et leur migration à travers la paroi vasculaire.

La perméabilité vasculaire est finement régulée, notamment par les angiopoïétines-1 et -2 (Ang-1 et -2). Ces deux protéines se lient au même récepteur Tie2 mais ont des effets antagonistes. Dans ce cadre, Ang-1 inhibe la perméabilité vasculaire en resserrant les jonctions intercellulaires (Gamble et al. 2000; Thurston et al. 2000). Au contraire, Ang-2 induit le détachement des CML et un relâchement de la MEC sous-jacente, permettant ainsi la migration des CE (Maisonpierre et al. 1997).

Enfin, la dégradation de la MEC fait intervenir des enzymes comme les métalloprotéinases (MMPs) qui permettent non seulement la libération de l'espace nécessaire aux CE pour migrer hors de la paroi vasculaire, mais aussi le relargage de molécules séquestrées dans la MEC (bFGF, VEGF). Plus d'une vingtaine de sous-types de MMPs ont été identifiés et jouent un rôle important dans la phase précoce de l'angiogenèse (Nelson et al. 2000).

b) Prolifération et migration des CE

Dès que la paroi vasculaire est franchie, et la MEC étant dégradée, les CE vont proliférer et migrer vers les sites distants en créant des bourgeons capillaires dans le cas de l'angiogenèse par bourgeonnement. De nombreuses molécules régulent l'angiogenèse, et bien qu'il soit difficile d'attribuer un rôle précis à chacun des acteurs moléculaires, certains éléments de réponses peuvent être apportés.

En effet, il apparaît clair que cette étape de l'angiogenèse est avant tout sous le contrôle des VEGFs, angiopoïétines, FGFs, PDGFs et de leurs interrelations.

Les VEGFs et leurs récepteurs jouent un rôle clé (Ferrara et al. 2003; Leung et al. 1989). De plus, le VEGF stimule l'expression de la eNOS et le NO active la libération du VEGF (Kroll et al. 1998). L'inactivation du gène codant pour la NO synthase endothéliale (*eNOS*) montre que le NO a un effet pro-angiogénique dans un modèle d'ischémie du membre inférieur (Murohara et al. 1998).

L'Ang-1 est chémoattractif pour les CE en potentialisant l'effet du VEGF (Suri et al. 1998). L'Ang-1 permet aussi la maturation et la stabilisation des vaisseaux.

Les membres de la famille FGF et PDGF stimulent aussi la croissance endothéliale et recrutent des cellules mésenchymateuses et/ou inflammatoires qui, à leur tour, sécrètent des facteurs angiogéniques (Carmeliet 2000; Hirschi et al. 1999).

Des membres de la superfamille du TGF- β comme l'activine A ou le TNF α sont des cytokines qui, dans différents modèles, inhibent ou activent la croissance endothéliale (Pepper 1997). Le TNF α module la prolifération des CE induite par le VEGF en agissant par interférence au niveau de la phosphorylation de VEGFR-2 (Guo et al. 2000). Enfin, des chémokines comme la Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP-1) stimule la prolifération des CE (Belperio et al. 2000).

Les molécules impliquées dans les interactions cellule-matrice comme les intégrines $\alpha v \beta 3$ ou $\alpha 5 \beta 1$ (Eliceiri et al. 1999), ou cellule-cellule comme PECAM-1 (Ilan et al. 1999) et VE-cadhérine (Grazia Lampugnani et al. 2003), et les éphrines (Wilkinson 2000) jouent un rôle majeur dans la prolifération et la migration des CE.

Inversement, certaines molécules peuvent empêcher l'étape d'angiogenèse comme la chondromoduline-1 (Hiraki et al. 2000), l'angiostatine (O'Reilly et al. 1994), l'endostatine (O'Reilly et al. 1997), l'antithrombine III, les interférons ou le facteur de croissance midkine (van der Horst et al. 2008).

c) Structuration des vaisseaux

L'organisation tridimensionnelle du réseau vasculaire doit être structurée et ordonnée à mesure que celui-ci s'étend et se propage dans les tissus non vascularisés. Cette propagation se fait notamment lors de l'angiogenèse par bourgeonnement. Des néovaisseaux peuvent apparaître par bourgeonnement, latéralement à des vaisseaux préexistants, en réponse à des stimuli proangiogéniques.

Dans ce processus, les néo-vaisseaux vont créer des ramifications, aussi appelés « branching ». A chaque bourgeonnement se trouvent deux types de cellules : la « tip cell » et les « stalk cells ». La « tip cell », qui correspond à la cellule apicale, va migrer et proliférer, s'étendre ou se rétracter via la formation de filipodes vers toutes les directions, tandis que les « stalk cells » sont entraînées derrière la « tip cell ». Elles allongent la ramification, prolifèrent, forment des jonctions, se fixent à la MEC et commencent à former un lumen connecté au système vasculaire. Enfin, un 3^{ème} type de cellules endothéliales, les « Phalanx cells », plus quiescentes, viennent consolider les vaisseaux néo-formés. Ces trois types de cellules sont spécialisées dans la formation des ramifications (« branching ») (**Figure 24**) (Baldessari et al. 2008; De Smet et al. 2009).

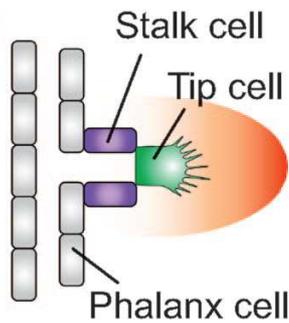


Figure 24 : Représentation schématique d'une « tip cell » (vert), suivie de « stalk cells » (violet) et de « Phalanx cells (gris)
D'après (De Smet et al. 2009)

Le processus de ramification se divise en plusieurs étapes, qui sont sous le contrôle de nombreuses molécules.

(1) Régulation des cellules apicales ou « tip cells »

Plusieurs études ont montré que le processus de sélection et d'induction de la « tip cell » était induit par les signalisations du VEGF et de Notch. En effet, via le récepteur VEGFR2, un gradient de VEGF induit une cascade de signalisation permettant à la CE de devenir « tip cell » (Gerhardt et al. 2003). Les cellules voisines qui reçoivent ces signaux ne deviennent pas « tip cells », mais « stalk cells ». Cette inhibition est engendrée par la « tip cell » elle-même sur les autres cellules, via la signalisation Dll4/Notch (Hellstrom et al. 2007; Noguera-Troise et al. 2006; Suchting et al. 2007). En effet, Dll4 (Delta-like ligand 4) a été plus récemment montré comme régulateur négatif de l'angiogenèse (Lobov et al. 2007).

La formation des filopodes dans la CE « tip cell » est elle, régulée par la neuropilin-1 et la synectine par exemple (Chittenden et al. 2006; Geretti et al. 2008), ou les cytokines inflammatoires $TNF\alpha$ (Sainson et al. 2008). L'angiomotine, une protéine associée à la membrane, contrôle aussi la migration des CE via son domaine de liaison au domaine PDZ (Aase et al. 2007). Les molécules de guidance axonale sont aussi impliquées dans la navigation des « tip cells ». Le KO du gène *Unc5B* induit des filopodes ectopiques lors du développement de la rétine (Lu et al. 2004).

Le rôle du bFGF dans ce système n'a pas été établi. Le bFGF est plus connu dans le système de développement des voies respiratoires chez la drosophile, où il détermine la spécification des « tip cells » épithéliales et induit la croissance des tubes épithéliaux. Les tubes épithéliaux se forment de la même façon que les tubes endothéliaux (Ghabrial et al. 2006; Horowitz et al. 2008), c'est pourquoi l'implication du bFGF dans ce processus n'est pas à exclure, d'autant plus qu'une étude a montré la régulation de la migration des « tip cells » par les FGFR (Vitorino et al. 2008). Cependant, le mécanisme par lequel le niveau de FGFR déterminerait aussi la spécification de la CE « tip cell » par rapport à la « stalk cell » n'est pas encore clair.

(2) Régulation des « stalk cells »

Comme nous l'avons dit précédemment, les « stalk cells » sont induites par la signalisation Dll4/Notch. Cette signalisation atténue la réponse migratoire engendrée par le VEGF, empêche l'extension des filopodes et inhibe la formation des ramifications en diminuant l'expression des récepteurs 2 et 3 au VEGF et de la neuropilin-1 (NRP1) (Tammela et al. 2008; Williams et al. 2008). Une cible de la voie Notch, Nrarp (Notch-regulated ankyrin-repeat protein), exprimée dans les « stalk cells », stimule d'ailleurs la signalisation Wnt dans ces cellules qui permet leur stabilisation (Phng et al. 2009).

Pour former le tube endothélial, les « stalk cells » doivent se diviser et maintenir un contact permanent avec la « tip cell ». Les mécanismes moléculaires impliqués dans ce processus de contact cellulaire sont encore obscurs. La VE-cadhérine est importante dans le maintien du contact cellule-cellule, puisque son absence induit une migration non directionnelle des cellules non connectées (Vitorino et al. 2008). La signalisation Wnt induite par Nrarp empêche la rétraction des CE en renforçant les jonctions intercellulaires (Phng et al. 2009). Enfin, la signalisation FGF est aussi impliquée dans l'intégrité et l'homéostasie vasculaire à travers un renforcement des jonctions entre CE (Murakami et al. 2008).

d) Formation des tubes endothéliaux

Après avoir migré et proliféré, les CE s'assemblent en tubes capillaires au sein desquels se forme la lumière des vaisseaux nouvellement formés. La formation du lumen vasculaire résulte de la fusion intracellulaire et intercellulaire entre les vacuoles des cellules. Les vacuoles se forment par pinocytose et coalescent pour créer une lumière entre les CE (**Figure 25**).

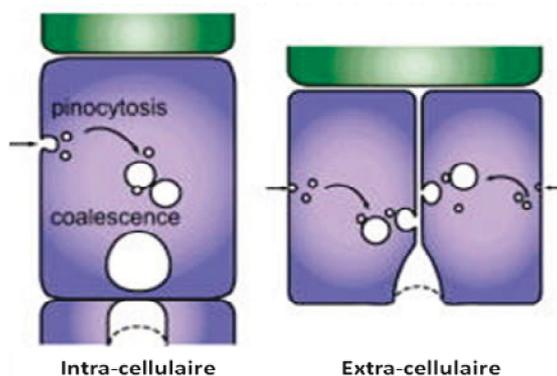


Figure 25 :
Représentation schématique du modèle de fusion intracellulaire et intercellulaire entre les vacuoles dans la formation de la lumière vasculaire
D'après (De Smet et al. 2009)

La formation des vacuoles dépend de l'interaction des intégrines avec la MEC, alors que la fusion des vacuoles requière le réarrangement du cytosquelette d'actine et des microtubules (Davis et al. 2002). Les petites GTPases Rac1 et cdc42, mais pas RhoA, interviennent donc, et

se retrouvent accumulées à la membrane des vacuoles durant la luminogénèse (Koh et al. 2008).

Une fois la lumière formée, des signaux additionnels de prolifération et de croissance des CE permettent la modification de la taille du lumen, comme le VEGF (Ruhrberg et al. 2002), Notch (Sainson et al. 2005) et la laminine (Jakobsson et al. 2008). En association avec le VEGF, l'Ang-1 augmente également le diamètre du lumen (Suri et al. 1998), et les intégrines $\alpha\beta3$, $\alpha5\beta1$ le régulent aussi (Bayless et al. 2000).

En revanche, certains facteurs endogènes inhibent la formation de la lumière comme la thrombospondine-1 (TSP-1), l'angiostatine, l'endostatine et le produit du gène *tubedown-1* (*tbdn-1*) (Gendron et al. 2000).

e) Différenciation artério-veineuse

A la formation des tubes endothéliaux s'ajoute une différenciation artério-veineuse des CE, qui est une étape importante dans la formation des vaisseaux sanguins. Elle est régulée par des facteurs intrinsèques et extrinsèques.

Facteurs intrinsèques

La direction et le flux sanguin sont deux paramètres intrinsèques qui peuvent déterminer les différences structurales et fonctionnelles entre les artères et les veines (le Noble et al. 2004; Nguyen et al. 2006).

La différenciation endothéliale est également induite par l'expression de gènes codant pour différentes molécules telles que des ligands, des récepteurs et des facteurs de transcription. Le système le plus connu est le ligand transmembranaire EphrineB2 et son récepteur à tyrosine kinase EphB4. Ce système Eph/Ephrine est critique dans ce processus. L'EphrineB2 est un marqueur des CE et des CML artérielles alors que EphB4 est un marqueur spécifique des veines (Wang et al. 1998). Enfin, d'autres gènes sont exprimés spécifiquement dans les artères (Cx40) ou les veines (Endomucine) (dela Paz et al. 2009). Plus récemment, une protéine impliquée dans le trafic vésiculaire, la synectine, a été impliquée dans la différenciation artério-veineuse puisque les souris délétées pour le gène *synectine* présentaient une altération du réseau artériel rénal avec une diminution du marqueur EphrinB2 (Chittenden et al. 2006).

Facteurs extrinsèques

La plupart des connaissances sur les facteurs extrinsèques proviennent surtout d'études réalisées chez le poisson-Zèbre. La voie Sonic-Hedgehog (Shh) est fortement impliquée dans le devenir des CE artérielles. Son rôle a été identifié à l'aide d'embryons mutants pour le gène

codant pour Shh, qui n'expriment pas le marqueur artériel EphrineB2a (homologue de EphrineB2 chez le poisson-zèbre) (Lawson et al. 2002).

Des études réalisées chez la souris et le poisson-zèbre ont aussi impliqué la signalisation du VEGF dans la régulation de la différenciation artérielle (Lawson et al. 2002; Stalmans et al. 2002).

Enfin, la signalisation Notch favoriserait également le devenir artériel des CE, et ce, en réprimant la différenciation veineuse (Lawson et al. 2001). En effet, l'inhibition de la signalisation Notch chez le poisson-zèbre a conduit à la réduction, voire l'extinction, de l'expression d'EphrineB2. Inversement, l'activation de la voie résulte en la diminution d'un marqueur veineux Flt4.

f) Remodelage vasculaire

Une fois le réseau endothélial formé, les cellules murales vont stabiliser les vaisseaux naissant en fournissant des facteurs de survie et anti-prolifératifs aux CE (Hoch et al. 2003). Les 2 grands types de cellules murales sont les CML, qui recouvrent les artères et les veines, et les péricytes, qui forment une simple couche de cellules autour des capillaires. Ainsi, la maturation des artères par exemple implique un épaississement médial de la paroi vasculaire via une hyperplasie des CML et la déposition de MEC. Le diamètre luminal est alors réduit, et la résistance augmente.

Le développement et le recrutement des CML requièrent de nombreuses molécules (Betsholtz et al. 2005). Le PDGF-BB est chémoattractant pour les CML (Lindahl et al. 1998), ainsi que le VEGF (Carmeliet 2000). Soncin et al. ont mis en évidence le rôle de la VE-Statine, un inhibiteur du recrutement des CML induit par le PDGF-BB (Soncin et al. 2003).

Le PDGF sécrété par les CE attire les cellules périvasculaires exprimant le PDGFR, amenant à leur attachement à l'endothélium. En retour, la signalisation du TGF- β est activée : le TGF- β 1, le récepteur TGF- β R2, l'endogline et Smad5 stimulent la différenciation des CML tout en inhibant la prolifération et la migration des CE (Pepper 1997). De plus, cette signalisation induit une altération de la MEC (Risau 1997). Les molécules de la MEC, comme le collagène, la laminine, la fibronectine, l'élastine, les glycosaminoglycanes, les proteoglycanes et les molécules d'adhésion sont en effet nécessaires pour la maturation, la différenciation et la stabilisation endothéliale (Chen et al. 2005; Rhodes et al. 2007; Stringer 2006).

Les souris invalidées pour le gène *Edg-1* (Endothelial Differentiation sphingolipid G-protein-coupled receptor-1) présentent de fortes similarités phénotypiques avec celles invalidées pour le gène *PDGF-BB*, c'est-à-dire une absence de migration des CML (Kluk et al. 2002). La voie

de la sphingosine-1-phosphate (S-1-P) serait donc essentielle au recrutement des cellules murales.

L'ang-1 et Tie2 jouent un rôle majeur dans la stabilisation des interactions CE-CML (Suri et al. 1996).

D'autres molécules comme l'endothéline-1, le système Eph/Ephrine ou encore la N-cadhérine ont été décrites comme favorisant la différenciation des CML, le recrutement des cellules murales ou encore la stabilisation de leur interaction avec les CE.

Enfin, les jonctions cellule-cellule participent aussi au remodelage des vaisseaux néo-formés. Ces structures spécialisées dans le maintien de l'intégrité et de la fonction endothéliale vont permettre une perméabilité des vaisseaux correcte et participent aux signalisations intracellulaires (Dejana 2004).

3. L'artériogénèse

L'artériogénèse consiste en une augmentation du diamètre des vaisseaux artériels pré-existants. Mécaniquement, l'artériogénèse est liée à une augmentation de pression et de débit sanguins qui créent des forces hémodynamiques sur la paroi endothéliale des vaisseaux (Heil et al. 2004). Le diamètre du vaisseau augmente jusqu'à ce que le stress subit par l'endothélium soit normalisé (Prior et al. 2004). Le stress mécanique perçu par l'endothélium va ensuite l'induire à produire des substances chimiques permettant l'augmentation du diamètre vasculaire. L'augmentation des forces de cisaillement (ou « shear stress ») cause notamment une augmentation du taux de MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1), molécules exprimées à la surface des vaisseaux. Ceci conduit à l'activation, l'adhésion et la migration des monocytes circulants à l'endothélium. Après la maturation en macrophages, ces cellules circulantes produisent et sécrètent des facteurs de croissance additionnels et des cytokines comme le TNF α , qui fournit un environnement inflammatoire aux cellules pour leur développement (Arras et al. 1998). Les macrophages sont aussi la principale source de protéases telles que les MMP, qui vont modéliser l'espace autour des artères pour la croissance des CML (Polverini et al. 1977). Les facteurs de croissance sécrétés par les monocytes ou déjà présents tels que le bFGF et le TNF α facilitent alors la prolifération des CML, permettant au vaisseau de s'élargir. Dans ce processus, le PDGF-BB est un acteur essentiel au recrutement et à la migration des CML le long des tubes endothéliaux (Lindahl et al. 1999).

Un autre facteur majeur dans l'augmentation de la taille des vaisseaux est le monoxyde d'azote (NO), dont la production augmente en réponse au flux jusqu'à ce que les contraintes de cisaillement perçues par l'endothélium reviennent à un niveau normal.

Tout ce processus amène donc à la maturation des vaisseaux, la phase finale de l'artériogénèse. Elle est caractérisée par une diminution de la prolifération, de la migration et de l'activité protéolytique, mais aussi par la différenciation des CML à un phénotype contractile (Scholz et al. 2000).

Les cellules circulantes dérivées de la moëlle osseuse, c'est-à-dire les cellules progénitrices, mésenchymateuses et hématopoïétiques, sont aussi impliquées dans l'artériogénèse (Song et al. 2005).

III. Facteurs impliqués dans le développement vasculaire

De nombreuses molécules impliquées dans l'angiogénèse physiologique ont été identifiées et caractérisées depuis plusieurs années.

On peut brièvement résumer les classes majeures de ces molécules :

- Les **facteurs de croissance (et leurs récepteurs)** tels que le VEGF (Ferrara et al. 2003), les Angiopoïétines (Loughna et al. 2001), le PDGF (Heldin et al. 1999), le FGF (Javerzat et al. 2002) ou encore le TGF- β (Pepper 1997).

- Les **molécules d'adhésion** des familles des intégrines (Eliceiri et al. 2001; Rupp et al. 2001) et des cadhérines (Bazzoni et al. 2004).

- Les **protéines de la MEC** telles que la fibronectine, les collagènes ou les laminines (Sottile 2004).

- Des **morphogènes** tels que le couple Eph/Ephrine (Cheng et al. 2002).

- Des **protéinases** telles que les MMP-2 et -9, les activateurs du plasminogène (uPA et tPA) et leurs **inhibiteurs** Tissue Inhibitor of Metalloproteinase et plasminogen activator inhibitor (TIMP et PAI)(Pepper 2001; Visse et al. 2003).

- Des **molécules de signalisation intracellulaires** telles que les MAPKinases (Herrera et al. 2002), la PKA (Tortora et al. 2002), la PKB/AKT (Shiojima et al. 2002), les PKC (Parker et al. 2004) ou encore les GTPases de la famille Rho (Ridley 2001).

- Des **facteurs de transcription et éléments régulateurs** tels que HIF (Hypoxia Inducible Factor)(Pugh et al. 2003), les inhibiteurs de la différenciation Id1/3 (Lyden et al. 1999), NF κ B (De Martin et al. 2000), Ets (Sato et al. 2001) ou encore les produits de gènes homéotiques comme Hox D3 et B3 (Myers et al. 2000).

- D'**autres molécules** comme la synectine (Chittenden et al. 2006) ou les éléments du système Wnt/Fzd (Dufourcq et al. 2008).

Dans ce chapitre, nous développerons tout d'abord certains de ces facteurs tels que le bFGF et le TGF β car ils entrent dans la problématique de cette thèse. Le lecteur pourra trouver la description de leurs voies de signalisation ainsi que les régulations croisées avec le système Wnt/Fzd. Ensuite, nous mettrons en avant les données bibliographiques qui démontrent le rôle du système Wnt/Frizzled dans la formation des vaisseaux.

A. Basic Fibroblast Growth factor ou bFGF

Les FGFs (Fibroblast Growth Factors) et leurs récepteurs spécifiques (FGFRs) recouvrent toute une famille de molécules de signalisation large et complexe qui joue un rôle important dans de nombreux processus impliqués dans le développement embryonnaire et l'homéostasie tissulaire. Ce sont des molécules pléiotropes capables d'activer une variété de types cellulaires, ce qui leur permet d'orchestrer l'angiogenèse en régulant diverses interactions cellule-cellule.

La famille FGF comporte 18 membres chez le mammifère (FGF1-FGF10 et FGF16-FGF23) regroupés en 6 sous-familles qui sont classées selon des critères phylogéniques et d'homologie de séquences (Beenken et al. 2009). Les autres facteurs, homologues aux FGF (précédemment nommés FGF11-FGF14), ne font plus parti de la famille des FGF puisqu'ils n'activent pas les récepteurs aux FGF (Olsen et al. 2003).

Parmi les différents membres de la famille FGF, le basic Fibroblast Growth Factor (bFGF ou FGF2) fut le premier facteur angiogénique mis en évidence (Shing et al. 1984).

1. Le système ligand /récepteur du bFGF

Le bFGF est un des membres les mieux caractérisés. C'est un polypeptide glycosylé monomérique qui est exprimé de façon ubiquitaire (Bikfalvi et al. 1997; Nickel 2005). Son expression est complexe car au moins 4 isoformes chez l'humain (18, 22, 25.5 et 24 KDa) et 3 isoformes chez la souris (18, 21 et 22 KDa) du bFGF sont synthétisés (Arnaud et al. 1999; Florkiewicz et al. 1989; Prats et al. 1989).

Comme pour les autres FGF, le bFGF contient un domaine de liaison à l'héparine ou aux héparanes sulfates (HBS, Heparane Sulfate Binding Site), essentiel pour ses effets biologiques (Galzie et al. 1997). Il se lie ainsi avec une forte affinité aux protéoglycanes héparane sulfate situés à la surface de la plupart des cellules et dans la matrice extracellulaire (MEC)

(Vlodavsky et al. 1991). Le stockage du bFGF sert de réservoir qui peut être mobilisé par l'action des héparanases.

Le bFGF induit ses diverses fonctions en se liant et en activant ses récepteurs, les FGFR, qui appartiennent à la famille des tyrosines kinases (RTK). Il en existe 4, appelés FGFR-1, -2, -3 et -4. Ces récepteurs consistent en 3 domaines immunoglobulines extracellulaires (D1-D3), un domaine transmembranaire et un domaine tyrosine kinase cytoplasmique. Ils présentent différents profils d'expression et chacun possède différents variants issus de l'épissage alternatif (Partanen et al. 1992) (**Figure 26**).

Pour une activation optimale du récepteur, le ligand semble devoir être présenté par un héparane sulfate ou par l'héparine vraisemblablement par l'établissement d'un complexe ternaire FGF/ FGFR/ héparine (Kan et al. 1993). A l'image des autres RTK, la liaison du bFGF à ses récepteurs induit leur homodimérisation et leur transphosphorylation au niveau intracellulaire activant ainsi les voies de transductions sous-jacentes.

2. Voies de signalisation activées par le bFGF

Communément aux autres membres de la famille FGF, la liaison du bFGF aux FGFR active de multiples voies de signalisations. Les deux principaux substrats intracellulaires de FGFR sont la phospholipase $C\gamma 1$ (PLC $\gamma 1$ ou FRS1) et le substrat 2 du FGFR (FRS2) (**Figure 26**).

La phosphorylation de la queue cytoplasmique de FGFR (Tyr766) crée un site de liaison pour le domaine SH2 de PLC $\gamma 1$ et est requis pour sa phosphorylation et son activation. Il s'ensuit un relargage de Ca^{2+} nécessaire à l'activation des kinases dépendantes du Ca^{2+} , et à la réorganisation du cytosquelette. La perte de cette voie ne semble pas empêcher la réponse proliférative (Mohammadi et al. 1992).

Au contraire, FRS2 s'associe constitutivement avec la région juxtamembranaire de FGFR. La phosphorylation de FRS2 est essentielle à l'activation du système Ras-MAPK (Mitogen-activated protein kinases), incluant p42/44MAPK, p38 et JNK, et de PI3K-Akt (Phosphoinositide 3 kinase-Akt) (Dailey et al. 2005). L'activation des MAPK permet la régulation des gènes cibles, plutôt impliqués dans la réponse mitogénique pour ERK1/2 et dans l'apoptose pour p38 et JNK. Mais cette réponse pro-apoptotique est contrecarrée par l'activation du système PI3K-Akt qui affecte l'expression des facteurs pro-apoptotiques et donc contribue à la protection contre la mort cellulaire (Schlessinger 2000).

L'activation de p42/44MAPK et p38 a été observée dans tous les types cellulaires, alors que l'activité des autres voies de signalisation varie selon le type cellulaire.

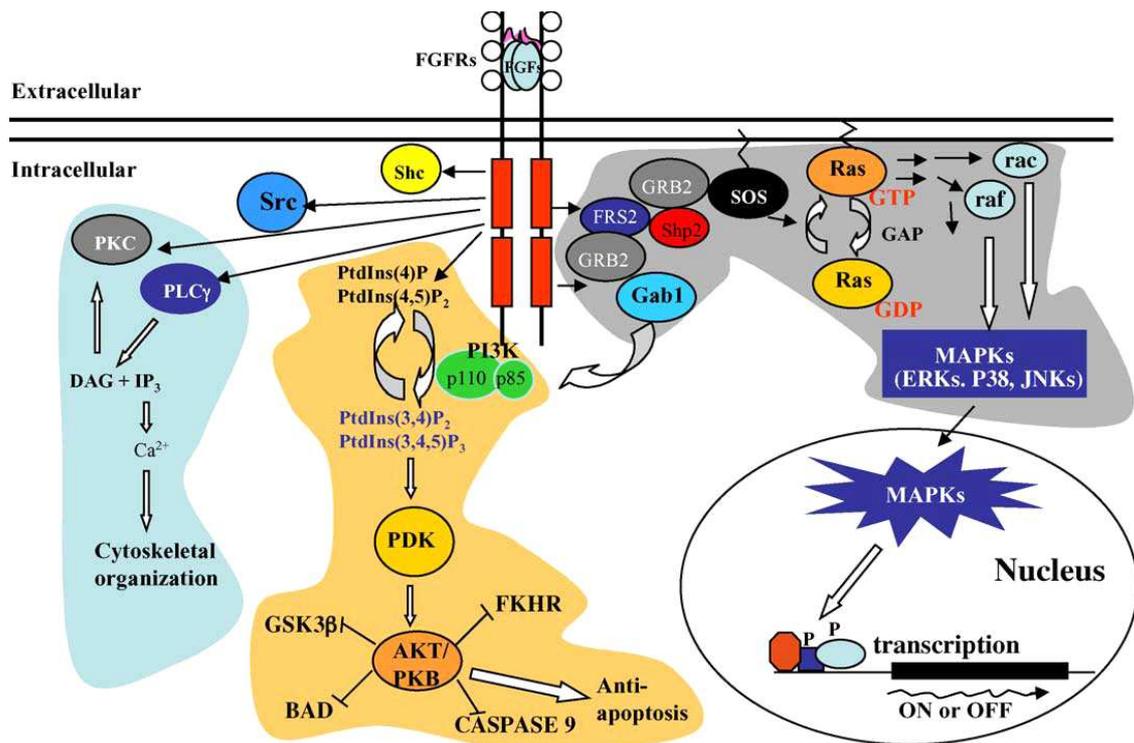


Figure 26 : Illustration des voies de signalisation du bFGF
D'après (Dailey et al. 2005)

Le bFGF peut donc moduler une variété de processus cellulaires, qui dépendent à la fois du type cellulaire et du stade de maturation. A ce jour, les efforts de la recherche s'organisent pour identifier les déterminants moléculaires intracellulaires qui médient chacun des effets biologiques et comment ils diffèrent selon les types cellulaires.

3. Rôle du bFGF dans le développement vasculaire

La capacité de la famille des protéines bFGF à promouvoir l'angiogenèse a été extrêmement liée à celle des autres facteurs de croissance angiogéniques. Cependant, le rôle précis joué par le bFGF dans ce processus reste encore incomplet.

Les propriétés angiogéniques du bFGF sont bien connues. En effet, le bFGF exogène stimule la prolifération (Esch et al. 1985) et la migration des cellules endothéliales *in vivo* (Ware et al. 1997), a des propriétés anti-apoptotiques (Yanagisawa-Miwa et al. 1992) et active la mitogénèse des CML et des fibroblastes qui induit le développement de larges vaisseaux

collatéraux (Scholz et al. 2001). Le bFGF stimule la formation de tubes endothéliaux dans une matrice tridimensionnelle de collagène (Montesano et al. 1986).

Ses propriétés angiogéniques ont aussi été mises en évidence dans le modèle de CAM (Flamme et al. 1991). Dans ce modèle, Parsons-Wingerter et al. ont d'ailleurs montré que le bFGF stimulait l'angiogenèse des petits vaisseaux dans l'arbre artériel (Parsons-Wingerter et al. 2000). *In vivo*, la surexpression ciblée dans le cœur du bFGF (Sheikh et al. 2001) augmente la ramification et la densité vasculaire. L'utilisation d'adénovirus exprimant un dominant-négatif de FGFR-1 dans des embryons murins indique également l'importance de ce récepteur dans l'induction et le maintien de la vascularisation de l'embryon (Lee et al. 2000). La surexpression d'une forme tronquée du FGFR-1 agit comme un dominant-négatif et bloque l'angiogenèse dans l'œil (Rousseau et al. 2000). Ces études montrent l'importance du système bFGF-FGFR dans le développement vasculaire.

L'invalidation des gènes codant pour les récepteurs *fgfr1* et *fgfr2* n'apporte pas beaucoup de renseignements sur leur implication dans le développement vasculaire dans la mesure où les souris *fgfr1*^{-/-} (Deng et al. 1994) et *fgfr2*^{-/-} (Xu et al. 1998) meurent avant la gastrulation. De plus, ni le knock-out de *fgfr3* ni celui de *fgfr4* ne montrent de défauts vasculaires (Colvin et al. 1996; Deng et al. 1996; Weinstein et al. 1998). Enfin, bien que les souris *bfgf*^{-/-} aient des anomalies dans le tonus et la pression vasculaire et une pression sanguine faible, elles présentent un développement global normal, ce qui suppose une redondance dans le système FGF-FGFR (Dono et al. 1998).

L'étude du rôle du bFGF dans la néovascularisation a aussi mis en évidence un dialogue entre la signalisation bFGF et celles des autres facteurs de croissance tels que le VEGF et le PDGF. Différentes études indiquent que le bFGF régule le système VEGF dans le processus angiogénique (Presta et al. 2005). Il active en synergie avec le VEGF la prolifération des CML (Couper et al. 1997), et stimule l'expression du VEGF dans les CE requise pour la réponse angiogénique du bFGF (Seghezzi et al. 1998). La protéine Shc pourrait être au centre des 2 voies puisqu'elle est recrutée aux FGFR lorsqu'ils sont activés, et qu'elle a un rôle crucial dans l'expression du gène VEGFR (Saucier et al. 2004).

Réciproquement, la signalisation du bFGF semble requérir la signalisation du VEGF pour son potentiel angiogénique. En effet, l'angiogenèse induite par le bFGF est inhibée par l'utilisation d'anticorps neutralisant le VEGF-A, ou bloquant le VEGFR (Kanda et al. 2004; Masaki et al. 2002; Seghezzi et al. 1998; Tsunoda et al. 2007).

En ce qui concerne le PDGF-BB, lors de la maturation des vaisseaux, le recrutement des cellules murales au niveau des micro-vaisseaux s'effectue notamment par l'action du PDGF-BB sur ces cellules qui expriment fortement leurs récepteurs (PDGFR) (Ostman 2004). Un effet synergique du PDGF-BB et du bFGF sur la migration des CML *in vitro* avait déjà été montré par Pickering et al. (Pickering et al. 1997). De récentes études ont montré que le PDGF-BB seul n'est pas suffisant pour induire la maturation des vaisseaux (Lu et al. 2007; Nissen et al. 2007). Bien que le bFGF semble être un modeste inducteur de la maturation des vaisseaux, l'effet synergique entre bFGF et PDGF-BB promouvrait la formation de vaisseaux stables, même si *in vitro*, nous avons montré que les cellules souches mésenchymateuses activées par sFRP1, le modulateur de la voie Wnt, exprimaient plus de transcrits *PDGF-BB* sans modulation du taux d'ARNm *bFGF* (Dufourcq et al. 2008).

4. La signalisation bFGF et le système Wnt/Fzd

Comme on vient de le voir, la voie additionnelle par laquelle la signalisation bFGF peut induire diverses réponses est l'activation ou la répression d'autres voies de signalisations. Parmi ces voies, on distingue aussi le système Wnt/Fzd.

Les FGFs et Wnts peuvent interagir dans de nombreux systèmes développementaux comme le développement du cerveau et des reins chez certains vertébrés (Moon et al. 1997). Ces effets résulteraient d'interrelation entre les composants de ces deux voies de signalisation ou de leur activation indépendante suite à la régulation des gènes cibles (**Figure 27**).

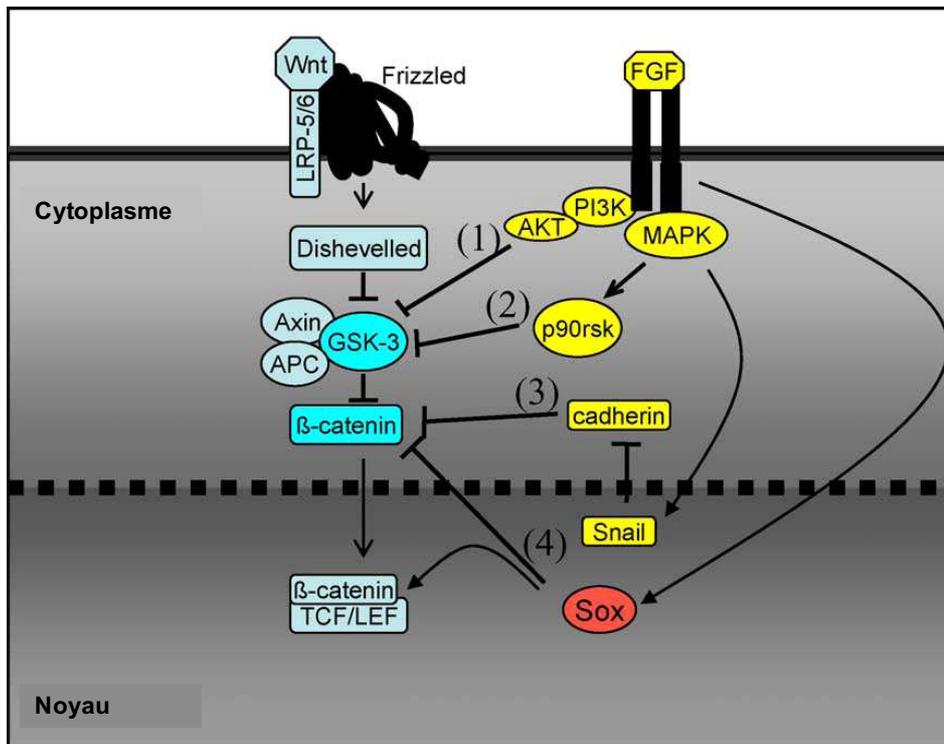


Figure 27 : Interrelation entre les voies de signalisation bFGF (jaune) et Wnt (Bleu)
D'après (Dailey et al. 2005)

La GSK3 β est une des cibles communes à ces 2 voies. Dans certains types cellulaires, il a été montré que l'activation des voies PI3K/Akt par un traitement au bFGF pouvait promouvoir la phosphorylation de GSK3 β , l'inactiver, et induire la translocation de la β -caténine dans le noyau dans les cellules endothéliales humaines (Holnthoner et al. 2002) et dans les cellules neurales (Israsena et al. 2004).

Le système bFGF-FGFR peut aussi moduler la voie Wnt. A travers l'activation de l'expression du facteur de transcription Snail, il peut reverser la répression de la β -caténine médiée par les E-cadhérines. En effet, FGFR1 est requis pour l'expression du facteur de transcription Snail qui diminue l'expression de la E-cadhérine. Ainsi l'expression ectopique de E-cadhérine dans le mutant FGFR1 atténue la signalisation Wnt3a en séquestrant la β -caténine dans le cytoplasme (Ciruna et al. 2001). Ceci permet de prouver un lien moléculaire entre les signalisations FGF et Wnt.

Enfin, l'induction des facteurs de transcriptions Sox par le bFGF, prouvée dans divers types cellulaires (Hayashi et al. 2004; Murakami et al. 2000), peut aussi résulter en une inhibition de la signalisation Wnt. Zorn et al. ont montré que les facteurs de transcriptions XSox3 ou XSox17 pouvaient inhiber la signalisation Wnt en réprimant l'activité transcriptionnelle β -caténine-TCF/LEF durant la formation de l'axe embryonnaire du xénope (Zorn et al. 1999). Ceci suggère un autre mécanisme par lequel le bFGF modulerait la voie Wnt.

B. Transforming Growth Factor- β ou TGF- β

La super-famille du Transforming Growth Factor- β (TGF- β) est composée d'une trentaine de membres que l'on retrouve dans tout le règne animal, dont les TGF- β , les activines, les Bone Morphogenic Proteins (BMP) et les mycostatines. Depuis sa découverte au début des années 80, le TGF- β est apparu comme un facteur de croissance impliqué dans des processus physiologiques essentiels comme le développement embryonnaire, la réparation tissulaire, la différenciation et le contrôle de la croissance cellulaire (Massague et al. 2006). La signalisation TGF- β a été impliquée dans certaines pathologies humaines, comme la fibrose tissulaire et la carcinogénèse, mais aussi dans des maladies vasculaires telles que l'athérosclérose et l'hypertension pulmonaire où TGF- β et BMP ont été les deux membres de la famille TGF- β les plus étudiés (Wu et al. 2009).

1. Voies de signalisation du TGF- β dépendantes des Smad

Le TGF- β est une protéine sécrétée qui existe sous 3 isoformes appelées TGF β -1, -2 et -3, dont la structure peptidique est hautement similaire. Chaque isoforme est constitué d'un peptide signal de sécrétion dans sa région N-terminale, d'une pro-région centrale appelée LAP (Latency-Associated Peptide) et d'une région C-terminale qui deviendra le TGF- β bioactif après maturation (Piek et al. 1999). La protéine TGF- β est donc synthétisée sous forme d'un précurseur latent (L TGF- β) qui requiert une maturation pour se fixer au récepteur. Cette maturation nécessite le clivage protéolytique de la pro-région. Une fois mature, elle se dimérise via des ponts disulfures pour produire une molécule active de 25 KDa à motifs structuraux très conservés, qui s'associera aux récepteurs du TGF- β et induira une réponse cellulaire.

En ce qui concerne les BMP, il en existe 20 isoformes. Contrairement au TGF- β , les BMP sont sécrétés directement sous forme active et régulés à travers diverses interactions réversibles avec des antagonistes comme noggine, chordine et DAN (Reddi 2001). Ces interactions déterminent la biodisponibilité des ligands TGF- β s/BMPs pour leurs récepteurs.

Les ligands TGF- β s/BMPs induisent une réponse cellulaire en se fixant à des récepteurs spécifiques ayant une activité de type serine/thréonine kinase (Massague et al. 2000). La famille des récepteurs aux TGF- β s/BMPs est constituée de deux sous-familles, similaires du point de vue structural, les récepteurs de type I et de type II (TGF- β RI et TGF- β RII). Ces récepteurs sont composés d'une petite région extracellulaire riche en cystéine et d'un domaine

intracellulaire dans lequel est situé leur domaine kinase. TGF- β RII a une activité kinase intrinsèque alors que TGF- β RI doit être phosphorylé pour être actif. Le TGF- β /BMP a une forte affinité avec les récepteurs de type II, s'y fixe, et recrute ainsi le récepteur de type I pour former un complexe hétéromérique. Il s'ensuit la phosphorylation du récepteur de type I, changeant la conformation du récepteur (**Figure 28**).

La transduction du signal des récepteurs jusqu'au noyau est assurée principalement par la phosphorylation d'une famille de protéines cytoplasmiques, les Smads (Massague et al. 2000). Cette famille est divisée en trois groupes fonctionnels différents : les Smads associées au récepteur ou R-Smad, qui interagissent de façon spécifique directement avec le TGF- β RI activé et sont spécifiques d'un ligand ; les co-Smads, médiateurs communs pour tous les membres de la famille du TGF- β ; et les Smads inhibiteurs ou I-Smad (Miyazono et al. 2000).

En réponse au TGF- β , les membres de la famille TGF- β RI nommés Activin receptor-Like Kinase 1 (ALK1) ou 5 (ALK5), phosphorylent respectivement Smad1 ou Smad2/3. En réponse au BMP, les récepteurs de type I (ALK1, 2, 3 ou 6) phosphorylent plutôt Smad1, Smad5 ou Smad8. Ces R-Smads sont ciblées à la membrane plasmique par les microtubules, où la protéine SARA (Smad-Anchor for Receptor Activation) les présente au récepteur (**Figure 28**).

Après phosphorylation par TGF- β RI, les R-Smads s'associent à l'unique co-Smad mis en évidence, Smad4, et ce nouveau complexe migre alors dans le noyau où il se lie à l'ADN et joue le rôle de facteur de transcription (**Figure 28**). L'activation transcriptionnelle spécifique des promoteurs des gènes cibles requiert le recrutement de facteurs supplémentaires tels que des facteurs de transcription (AP-1, TFE3 ou CBFA/AML, YY1), des adaptateurs comme FAST-1, ou encore des co-activateurs tel que CREB-binding Protein (CBP) et p300 (Massague et al. 2000) et des co-répresseurs (eg, Sno).

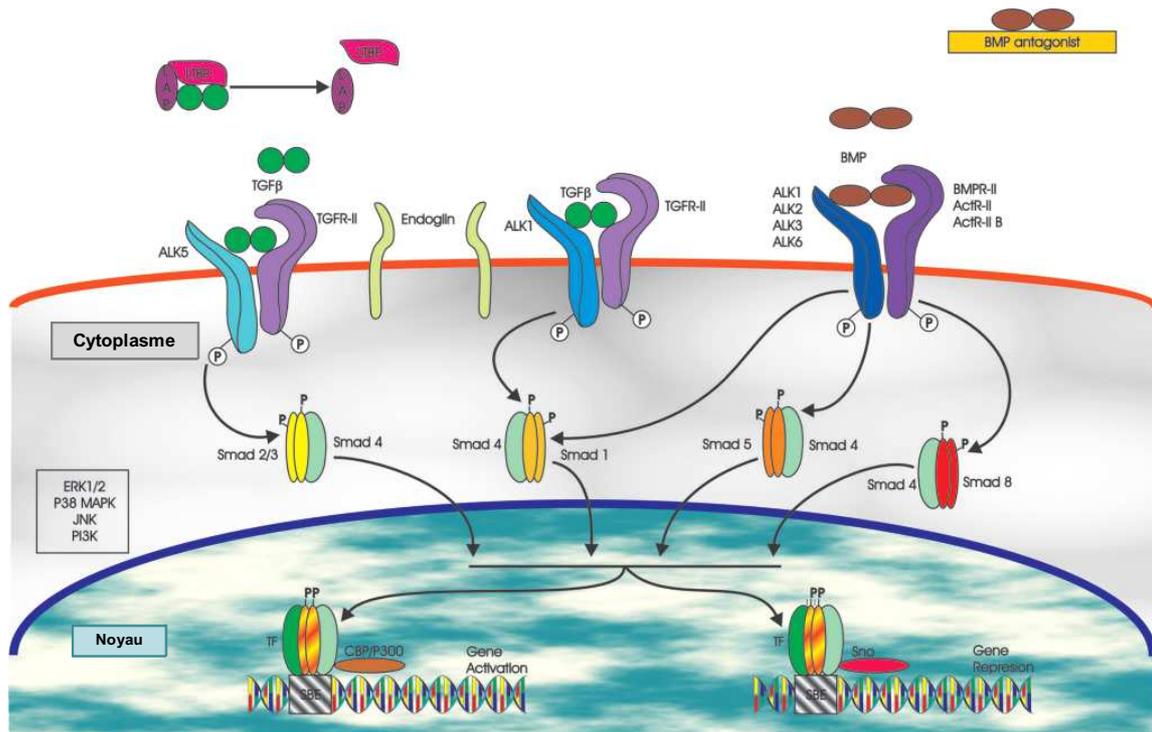


Figure 28 : Mécanisme général d'activation du récepteur au TGF- β et au BMP, et de la voie des Smad
D'après (Bobik 2006)

Les Smads dits inhibiteurs, comme Smad7, s'associent au TGF- β RI activé, empêchant alors la phosphorylation de Smad2 et Smad3 (Moustakas et al. 2001). De plus, Smad7 peut recruter deux ubiquitine-ligases E3, Smurf1 et Smurf2, au niveau du TGF- β RI activé, ce qui entraîne la dégradation par le protéasome du complexe des récepteurs. L'action inhibitrice de Smad7 pourrait fonctionner comme une boucle de rétrocontrôle négatif, l'expression de Smad7 étant induite par le TGF- β de façon dépendante des Smads (Massague et al. 2000).

2. Voies de signalisation du TGF- β indépendantes des Smad

La famille des protéines Smads représente les messagers hautement spécifiques du TGF- β . Cependant, d'autres voies de signalisation indépendantes des Smads peuvent être activées par le TGF- β , selon le contexte et le type cellulaire étudié, et pourraient participer à l'angiogenèse. Ainsi, il a été montré que le TGF- β pouvait activer les voies des MAP Kinases (p38, JNK et ERK1/2), de la PI3K, de RhoA et de la protéine phosphatase A2 (PP2A/P70s6K), uniquement par l'intermédiaire de ALK5 (**Figure 29**) (Derynck et al. 2003).

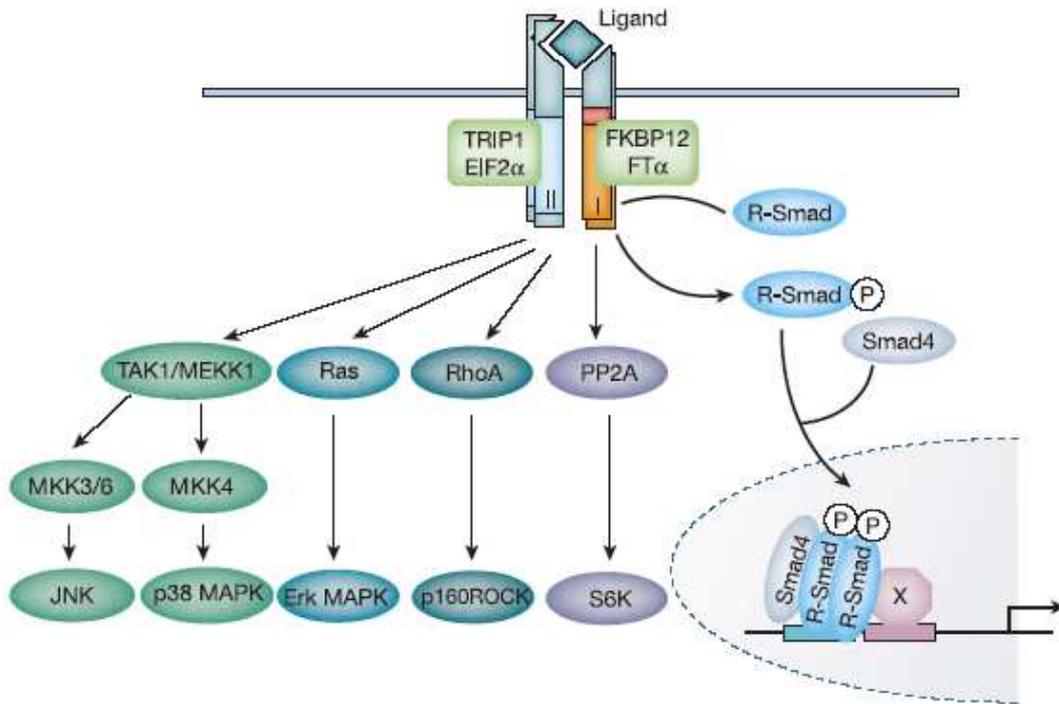


Figure 29: Voies de signalisation indépendantes des Smad activées par le TGF- β et les TGF- β RI et II

D'après (Derynck et al. 2003)

3. Rôle de la signalisation TGF- β dans le développement vasculaire

Le rôle du TGF- β dans le développement vasculaire est complexe. Son implication dans l'angiogenèse a été démontrée initialement par le fait qu'il génère des néovaisseaux après injection chez la souris (Folkman et al. 1987) ou encore dans le modèle du CAM (Yang et al. 1990).

Les TGF- β s/BMPs sont sécrétés par de nombreux types cellulaires, et notamment les cellules vasculaires (Pepper 1997). En effet, CE, CML, cellules mésenchymateuses, macrophages et lymphocytes répondent aux membres de la famille TGF- β . Des 3 isoformes TGF- β , TGF- β 1 est localisé dans les CE durant l'embryogénèse, suggérant qu'il est l'isoforme le plus impliqué dans l'angiogenèse (Akhurst et al. 1990). En effet, les isoformes 2 et 3 du TGF- β semblent être moins importants puisque les souris délétées pour chacun de ces ligands présentent une angiogenèse non altérée (Bartram et al. 2001; Kaartinen et al. 1995).

In vitro, le TGF- β exerce des effets bi-fonctionnels sur les cellules, stimulant la prolifération et la migration cellulaire à faibles concentrations, alors qu'il inhibe ces processus à fortes concentrations (Pepper 1997). Goumans MJ. et al. ont développé le modèle selon lequel le

TGF- β agirait avec un « effet biphasique » sur les cellules et sur l'angiogénèse (Goumans et al. 2003). Cet effet biphasique pourrait s'expliquer par l'implication différente de ces deux récepteurs, chacun ayant une affinité propre pour ce ligand (**Figure 30**). Ainsi, la signalisation TGF- β /ALK1 stimule la prolifération et la migration des CE, alors que TGF- β /ALK5 inhibe ces fonctions. En effet, les formes constitutivement actives de ALK1 et ALK5 initient des profils différents d'expression génique (Ota et al. 2002). Il a été montré que ALK1 activait l'expression du gène *Id1* (Inhibitor of Differentiation/Inhibitor of DNA-binding1-gene1), impliquée dans la prolifération, la migration endothéliale et dans la formation des tubes (Valdimarsdottir et al. 2002). En revanche, ALK5 induit l'expression de PAI-1 (Plasminogen activator inhibitor-1), un régulateur négatif de la migration endothéliale et de l'angiogénèse.

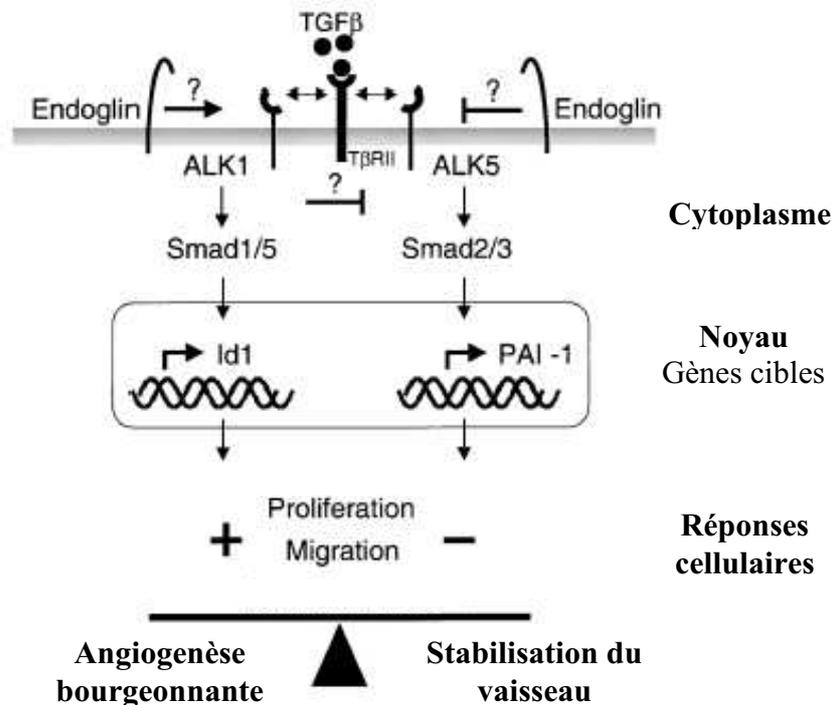


Figure 30 : Modèle de contrôle des phases angiogéniques exercé par le TGF- β
D'après (Goumans et al. 2003).

Bien que les CML expriment les récepteurs de type I et II, la plupart des effets de TGF- β sur les CML sont médiés via le complexe ALK5/TGF- β RII. La signalisation est complexe, faisant intervenir les Smad2/3 ainsi que des kinases comme p38MAPK, p42/p44 et JNK (Seay et al. 2005). Le TGF- β est un puissant facteur de différenciation des CML, augmentant l'expression de l' α SMA (α Smooth Muscle Actin), de la smMHC (smooth muscle Myosin Heavy Chain) et de la calponine. A faible concentration, il stimule également la prolifération en induisant le PDGF-AA. Mais il peut aussi atténuer l'activation des CML en s'opposant aux effets des

facteurs de croissance, des cytokines inflammatoires et des gènes affectant le remodelage vasculaire. L'inhibition de la prolifération des CML met en jeu les 2 types de voies du TGF- β , dépendante et indépendante des Smads (Khanna 2004).

Une des autres fonctions clés du TGF- β est de réguler l'expression des protéines de la MEC (Verrecchia et al. 2002), et de réguler la dégradation de la MEC en inhibant l'expression de métalloprotéinases et de serine-protéases, et en augmentant l'expression d'inhibiteurs de protéases. Ces effets empêchent le remodelage de la MEC et inhibe de ce fait l'angiogenèse.

Le TGF- β agit aussi de manière paracrine en stimulant la production de cytokines pro-angiogéniques, comme le VEGF, le TGF α et le MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) (Deckers et al. 2002; Ma et al. 2007; Vinals et al. 2001).

Les souris invalidées pour certains membres de la voie TGF- β /Smad présentent des phénotypes qui confirment que cette voie de signalisation est fortement impliquée dans le développement vasculaire (**Tableau 5**).

Gène	Phénotype	Létalité
<i>TGF-β1</i>	Anomalies d'hématopoïèse et de vasculogenèse	E10,5
<i>ALK1</i>	Anomalies d'angiogenèse, de différenciation et de recrutement des CML	E11,5
<i>ALK5</i>	Défauts d'angiogenèse. Anomalies dans la prolifération, la migration des CE et dans la production de MEC	E10,5
<i>TGF-βRII</i>	Anomalies d'hématopoïèse et de vasculogenèse du sac vitellin. Formation de capillaires dilatés.	E10,5
<i>endogline</i>	Anomalies de vasculogenèse du sac vitellin. Malformations cardiaques.	E11,5
<i>Smad1</i>	Pas de circulation chorio-allantoïde. Pas d'expression de VCAM-1	E9,5
<i>Smad5</i>	Développement anormal de la vascularisation du sac vitellin. Vaisseaux dilatés.	E10,5

Tableau 5 : Phénotype des souris invalidées pour certains membres de la voie TGF- β /Smad (Goumans et al. 2003).

Grâce à toutes ces études, l'implication de la signalisation de TGF- β et son rôle dans la vasculogénèse et l'angiogénèse sont de mieux en mieux compris (ten Dijke et al. 2007) (Gaengel et al. 2009) (**Figure 31**). Produit par les CE, il induit la différenciation des cellules périvasculaires en CML, via la voie Alk5/Smad2/3. Dans les CE, le TGF β peut promouvoir leur différenciation également via la voie Alk5/Smad2/3, et leur prolifération et leur migration via la voie Alk1/Endogline/Smad1/5. L'activation de chacune de ces voies dépend à la fois de la durée de la stimulation et du taux de TGF β . Comme on l'a dit précédemment, la signalisation Alk1 est inhibitrice de la signalisation Alk5, alors que celle-ci est nécessaire pour l'activation de la voie Alk1.

L'activation du TGF β et de sa signalisation requiert la communication entre les cellules vasculaires via les Gap junctions (Hirschi et al. 2003), ainsi que les intégrines (Bader et al. 1998; Zhu et al. 2002).

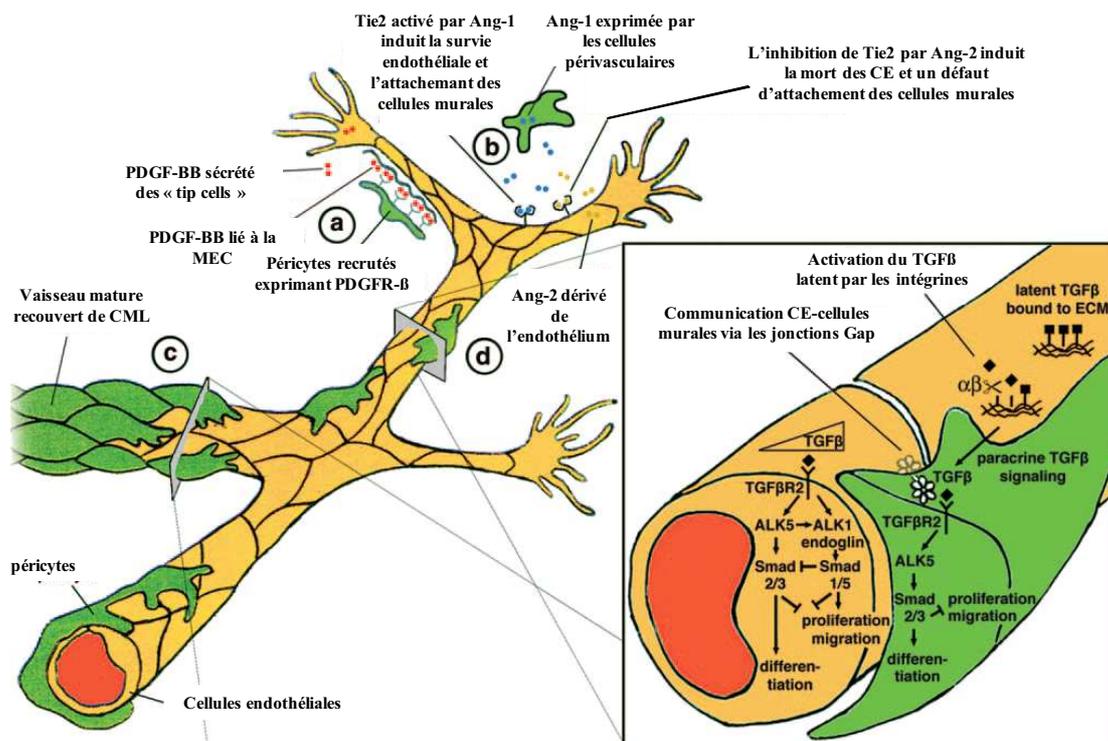


Figure 31: Signalisation du TGF- β dans l'angiogénèse
D'après (Gaengel et al. 2009)

4. La signalisation TGF- β et le système Wnt/Fzd

L'interrelation entre les voies de signalisation TGF- β /BMP et Wnt est connue depuis longtemps et est probablement la plus étudiée, surtout au niveau développemental. Les 2 voies interfèrent tout au long de la vie animale, et elles interagissent moléculairement à de multiples niveaux.

D'abord, le TGF- β /BMP et Wnt régulent réciproquement la production de leurs ligands. Ces régulations mutuelles sont importantes durant le développement, mais aussi dans les tissus adultes. Dans les embryons de poulet, Wnt-8c induit l'expression de Nodal (un membre de la famille TGF- β) d'une manière β -caténine-dépendante, qui est requise pour l'établissement de l'axe D/G (Rodriguez-Esteban et al. 2001). Ou encore, chez le Xénope, BMP2/4 régule l'expression de Wnt-8 et coopère avec dans l'induction du mésoderme (Hoppler et al. 1998), alors que BMP-2 diminue le taux de Wnt-7a et de β -caténine dans les cellules mésenchymateuses embryonnaire de poulet via p38, amenant à l'induction de la chondrogénèse (Jin et al. 2006).

Plusieurs gènes développementaux de différents systèmes sont co-régulés par les voies TGF- β /BMP et Wnt au niveau transcriptionnel, comme *siamois*, *chordin*, *noggin*, *crecen*. Chez le xénope, les 2 voies semblent converger au niveau du promoteur *Xtwn* pour le contrôle du gène, où Smad4, β -caténine et Lef1 forment un complexe et lient les éléments de régulation adjacents pour co-réguler l'expression de *Xtwn* requis pour l'établissement du centre organisateur de Spemann (Nishita et al. 2000). L'interrelation des 2 voies se fait donc aussi dans le noyau, où le complexe Smad/ β -caténine/Lef régule un ensemble de gènes cibles de manière synergique et de façon gène spécifique (**Figure 32**).

D'autres gènes de développement sont aussi régulés de cette manière (*Msx2* et *Emx2*), ainsi que des gènes impliqués dans la progression tumorale. En effet, les gènes comme *Ctgf*, *Robo1*, *Gpc1* et *Inhba* se retrouvent surexprimés dans des tumeurs du colon et du sein de souris transgéniques exhibant une signalisation TGF- β et Wnt active (Labbe et al. 2007).

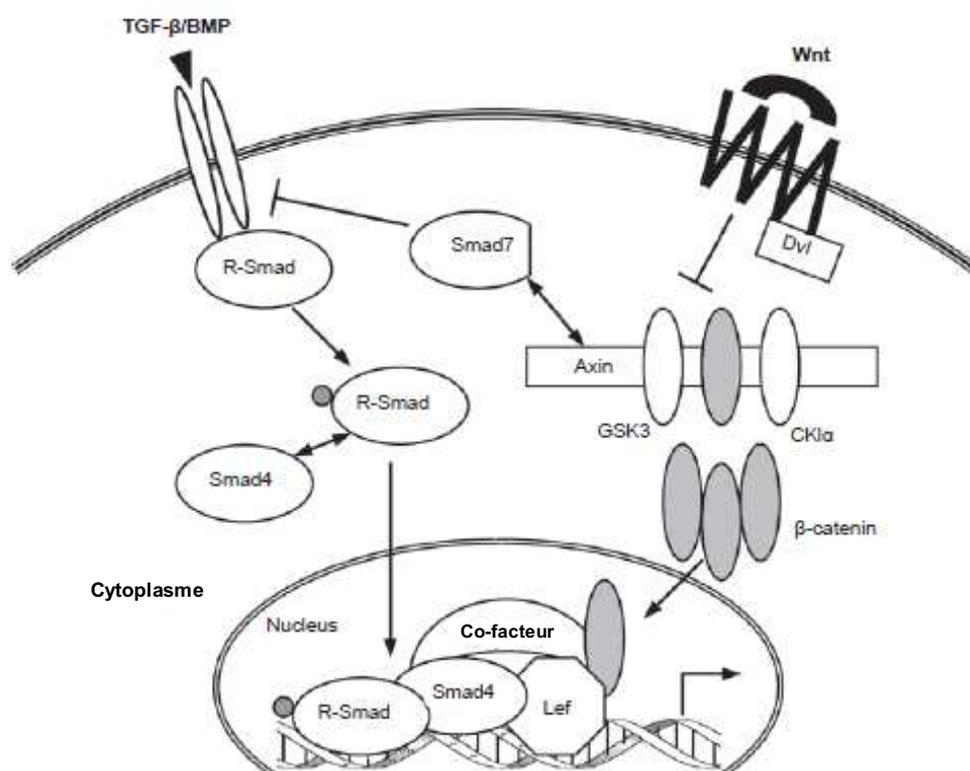


Figure 32 : Interrelation entre les voies de signalisation TGF-β/Wnt
D'après (Guo et al. 2009)

Enfin, de récentes études ont identifié des interactions entre les composants des 2 voies. Smad7, un Smad inhibiteur, peut interagir directement avec la β -caténine et promouvoir sa dégradation, et ainsi réduire l'activité de la voie Wnt. D'ailleurs, les souris surexprimant Smad7 présentent un développement de l'épiderme anormal suite à l'inhibition de la voie Wnt dans les cellules souches de l'épiderme (Han et al. 2006). Inversement, une étude récente décrit l'interaction entre Smad7 et l'axine, qui désassemble le complexe de dégradation de la β -caténine, lui permettant de se stabiliser, notamment au niveau des jonctions d'adhérence (Tang et al. 2008). Ces résultats opposés représentent différents aspects des fonctions de Smad7, de l'axine et de la β -caténine qui sont visiblement dépendantes du type cellulaire et spécifiques des conditions expérimentales.

Récemment, dans un contexte plus vasculaire, une étude a montré que le ligand BMP2 pouvait activer les deux voies de signalisations Wnt dans les CE artérielles pulmonaires (de Jesus Perez et al. 2009). D'un côté, il induit l'accumulation de la β -caténine en inhibant la GSK3 β via BMPR2. L'activité transcriptionnelle qui s'ensuit permet la survie et la prolifération des cellules. En même temps, BMP2 active aussi le recrutement de Dvl via la

phosphorylation de Smad1 ou Smad3, et promeut les GTPases RhoA et Rac1, nécessaires à la mobilité des cellules. Cette étude a donc suggéré l'activation des voies Wnt canonique et non canonique par un ligand de la famille TGF β dans l'angiogenèse, et semble être un bon exemple de l'interrelation qui existe entre les deux voies de signalisation, notamment dans la formation des vaisseaux.

C. Implication du système Wnt/Fzd au niveau vasculaire

Plusieurs études soulignent le rôle du système Wnt/Fzd dans le développement des vaisseaux sanguins. Ces évidences proviennent surtout d'analyses de souris transgéniques, et montrent que les signalisations canonique et non canonique fonctionnent dans la vascularisation (Parmelee et al. 2008; Zerlin et al. 2008). De plus, le laboratoire explore depuis plusieurs années l'implication des récepteurs Fzd et du modulateur de la voie Wnt, sFRP1, dans ce processus.

Ce chapitre répertorie les principales études démontrant l'implication du système Wnt/Fzd dans la formation vasculaire.

1. Analyse génétique du système Wnt/Frizzled dans le développement du réseau vasculaire

Peu de travaux impliquent le système Wnt/Fzd dans le développement du réseau vasculaire. Il faut préciser que tous les KO *wnt* chez la souris n'ont pas été rapportés et que la plupart des souris délétées pour les gènes *wnt* montrent de graves anomalies précoces et léthales durant la formation de l'embryon. Ces malformations massives pourraient masquer des phénotypes vasculaires plus tardifs induits par la délétion de facteurs Wnt. Quelques études majeures démontrent néanmoins leur implication.

Les souris invalidées pour *Wnt2*, ligand de la voie canonique (Shimizu et al. 1997), présentent des anomalies de vascularisation placentaire dues à une altération du réseau capillaire foetal dans le placenta (Monkley et al. 1996). Ces défauts sont liés à une augmentation de l'apoptose ou à une diminution de la prolifération des CE. L'invalidation du gène *Wnt4* induit un défaut de formation des vaisseaux sanguins coelomiques des gonades males (Jeays-Ward et al. 2003). D'ailleurs, la surexpression de *Wnt4* inhibe aussi la migration des CE lors du développement de la vascularisation des testicules (Jordan et al. 2003). L'invalidation du gène *Wnt7B* amène à une létalité périnatale due à des défauts respiratoires provenant d'un défaut vasculaire. Les nouveau-nés mutants présentent une perte de l'intégrité des CML causant une rupture des vaisseaux et des hémorragies pulmonaires (Shu et al. 2002).

En ce qui concerne les récepteurs Fzd, il a été montré que **Fzd5** était essentiel pour l'angiogenèse placentaire et vitelline. Les souris invalidées pour *fzd5* meurent à 11,5 dpc à cause d'anomalies d'angiogenèse placentaire en raison d'une réduction de la prolifération des CE (Ishikawa et al. 2001). Le plexus capillaire y est désorganisé et les larges vaisseaux du sac vitellin normalement observés sont peu développés. Il est important de noter que bien que les anomalies placentaires induites par la perte de *fzd5* soient létales, le reste de la vascularisation des embryons *fzd5*KO est normale. Ceci suggère qu'il existerait une redondance fonctionnelle au niveau des récepteurs Fzd pour la formation des vaisseaux chez l'embryon. De plus, le réseau vasculaire primitif est normalement constitué, ce qui laisse penser que les anomalies affectent plutôt la phase angiogénique. On note aussi une réduction de la prolifération des CE du sac vitellin. Un rôle essentiel pour Fzd5 dans le développement oculaire des mammifères a aussi été démontré récemment (Liu et al. 2008). En effet, la perte du gène *fzd5* chez la souris entraîne notamment un excès de cellules mésenchymateuses dans la cavité vitreuse et une vascularisation fœtale persistante au niveau de l'œil après la naissance. On ne sait pas quelle branche du système Wnt/Fzd est régulée par Fzd5 puisqu'il est capable de répondre à Wnt2 (voie canonique) et Wnt5a (voie non canonique) (He et al. 1997).

Toutes ces données montrent l'implication du système Wnt/Fzd dans le développement et le maintien de l'architecture vasculaire. Au cours de ma thèse, je me suis plus particulièrement intéressée au récepteur Frizzled4. Les études démontrant son implication dans la formation du réseau vasculaire sont décrites dans le paragraphe suivant.

Les souris *fzd4*KO sont viables et de taille réduite. Elles présentent des défauts développementaux au niveau du cerveau, de l'oreille interne, de l'œil et de l'œsophage (Rehm et al. 2002; Wang et al. 2001; Xu et al. 2004). Les souris *fzd4*KO ne sont pas non plus fertiles. La délétion de *fzd4* engendre une altération de la formation du corps lutéal, associée à des défauts structuraux du réseau vasculaire (Hsieh et al. 2005).

Une étude génétique a montré l'implication de **Fzd4** dans le développement vasculaire. En effet, les souris délétées pour le gène *fzd4* présente une malformation du réseau vasculaire rétinien secondaire et tertiaire (Xu et al. 2004). Ce phénotype est apparenté à la maladie de FEVR (Vitréorétinopathie Exsudative Familiale), une maladie caractérisée par des défauts développementaux où l'on observe une vascularisation incomplète au niveau de la rétine périphérique. En 2002, Robitaille et al. ont identifié chez l'homme un locus autosomale dominant correspondant au gène *fzd4* et associé à la maladie de FEVR (Kondo et al. 2003;

Robitaille et al. 2002). Les mutations du gène *fzd4* liées à cette maladie résultent en l'expression d'une protéine Fzd4 tronquée où il manque le domaine cytoplasmique et qui interfère avec l'activité de la protéine normale. Les mutants Fzd4 ne peuvent donc pas induire la signalisation (Robitaille et al. 2002), et forment des hétéro-oligomères défectueux avec les formes sauvages qui s'accumulent dans le RE (Kaykas et al. 2004).

La maladie de FEVR présente des caractères communs avec la maladie de Norrie, qui est une maladie rare liée au chromosome X, où le gène de la maladie de Norrie (NDP), ou *Norrin*, est muté, entraînant une cécité précoce due à une dégénérescence vasculaire rétinienne. Il s'avère en fait que **Norrin** est un ligand de haute affinité pour Fzd4, qui contrôle étroitement la vascularisation de la rétine et de l'oreille interne (Xu et al. 2004). Ceci se produit par une activation des récepteurs Fzd4 et LRP5 qui entraînent notamment une activation de la transcription TCF-dépendante. D'ailleurs, il a été montré que les souris invalidées pour le gène *Lrp5* présentaient une persistance de vascularisation anormale au niveau de la vitrée (Kato et al. 2002), et que les mutations « perte de fonction » chez l'homme pour LRP5 possédaient des phénotypes très similaires à ceux observés dans la FEVR (Toomes et al. 2004). De plus, les souris invalidées pour le gène *ndp* présentent un phénotype très proche de celui des souris *fzd4KO* et *Lrp5KO* (Rehm et al. 2002).

Plus récemment, notre laboratoire a montré le rôle de Fzd4 dans la réorganisation du cytosquelette des cellules endothéliales, et donc potentiellement dans la formation des néo-vaisseaux (Dufourcq et al. 2008). Cette étude sera plus détaillée dans la partie « Implication de Fzd4 dans la régulation des propriétés des cellules vasculaires ».

L'implication de Fzd4 dans le développement vasculaire émerge donc depuis quelques années maintenant, mais son rôle dans la formation des vaisseaux reste à éclaircir.

Ainsi, à partir de ces études, on voit que la caractérisation phénotypique des souris invalidées pour les ligands Wnt et leurs récepteurs Fzd peut illustrer l'implication du système Wnt/Fzd dans le développement vasculaire.

2. Expression des partenaires du système Wnt/Fzd et activité dans les cellules vasculaires

In vitro, une étude a montré que les CE expriment Wnt5a, 7a et 10b, et les CML expriment Wnt5a (Wright et al. 1999). *In vivo*, les vaisseaux du placenta expriment Wnt2 (Monkley et

al. 1996) et ceux du sac vitellin de la souris expriment Wnt5a et Wnt10b (Ishikawa et al. 2001).

Les récepteurs Fzd sont aussi exprimés au niveau des cellules vasculaires puisqu'on les retrouve, pour la plupart, exprimés dans les HUVEC (Cheng et al. 2003; Masckauchan et al. 2005; Wright et al. 1999). Ces récepteurs Fzd sont aussi exprimés *in vivo* dans une variété de tissus. Fzd2 est exprimé dans l'aorte et le tronc pulmonaire dès 12 jours post coïtum (van Gijn et al. 2001), dans les CML aortiques chez le rat (Castoldi et al. 2005), et Fzd1 et Fzd2 sont surtout exprimés dans les CML et peu dans les CE aortiques de rat adulte (Mao et al. 2000). Les vaisseaux du placenta et du sac vitellin expriment Fzd5 (Ishikawa et al. 2001). Fzd4 a été détecté chez la souris dans les vaisseaux et le stroma entourant l'embryon, ainsi que dans l'utérus durant l'implantation (Hayashi et al. 2009), au niveau de la vasculature en bordure des ovaires et des gros vaisseaux ovariens (Masckauchan et al. 2006), mais aussi au niveau des vaisseaux rétiniens (Masckauchan et al. 2006). On retrouve aussi Fzd4 exprimé au niveau des couches musculaire et endothéliale des artères et des artérioles, mais pas des veines chez la souris (B. Descamps, résultats non publiés). Fzd6 a été détecté dans certains vaisseaux sanguins et dans l'utérus durant l'implantation (Hayashi et al. 2009) et sur l'endothélium des artères et des veines chez la souris (R. Chauvel, résultats non publiés). sFRP1, le Fzd circulant, modulateur de la voie Wnt, est fortement exprimé dans la média et l'endothélium de l'aorte, chez la souris spécifiquement à l'âge adulte (Jaspard et al. 2000).

En ce qui concerne les protéines centrales Dvl, *in vivo*, Dvl1 est retrouvé dans les CE vasculaires durant la néovascularisation après infarctus du myocarde (Blankesteyn et al. 2000). Cette isoforme serait impliquée dans la prolifération et la migration des myofibroblastes durant ce processus (Chen et al. 2004). Les protéines Dvl sont aussi exprimées au niveau des mésoangioblastes, qui sont des cellules souches dérivées des vaisseaux (Tagliafico et al. 2004).

La localisation cytoplasmique et/ou nucléaire de la β -caténine, acteur clé de la voie canonique, est un évènement commun au développement embryonnaire des vaisseaux sanguins, mais beaucoup plus rare chez les adultes. Durant l'angiogenèse et le remodelage vasculaire associé à un état pathologique, la β -caténine cytoplasmique et/ou nucléaire des CE peut être observée, comme dans les tumeurs du cerveau (Goodwin et al. 2002). Durant le développement embryonnaire, on peut observer de la β -caténine nucléaire et/ou cytoplasmique dans les capillaires fœtaux et dans les artères et les veines (Eberhart et al. 2000; Eberhart et al. 2000). Elle est exprimée dans les CE des capillaires néoformés et dans

les artères préexistantes lors de l'infarctus du myocarde (Blankesteyn et al. 2000). Elle est aussi exprimée dans l'angiogenèse tumorale (Yano et al. 2000; Yano et al. 2000).

In vivo, la localisation de la β -caténine de la membrane au noyau, qui est un indicateur de la signalisation canonique, s'effectue dans les CE vasculaires durant la néovascularisation après infarctus du myocarde (Blankesteyn et al. 2000). D'ailleurs, l'activité transcriptionnelle de β -caténine/TCF s'observe via un système rapporteur dans les CE (Maretto et al. 2003) et chez l'adulte dans les néo-vaisseaux (Barandon et al. 2003).

Il a été montré *in vitro* que les cellules endothéliales pouvaient répondre aux ligands Wnt via la voie canonique. Par exemple, la transfection de Wnt1 dans les HUVEC augmente leur prolifération via une stabilisation de la β -caténine entraînant une transactivation de gènes cibles par le facteur de transcription TCF (Wright et al. 1999). L'augmentation de la dégradation de la β -caténine corrèle avec la survie des CE (Wu et al. 2003). L'expression ectopique de la β -caténine, Wnt1 ou Wnt5a stimule la prolifération des HUVEC (Masckauchan et al. 2006; Masckauchan et al. 2005). Ce processus met en jeu la phosphorylation de Dvl2 et Dvl3 dans les CE. De plus, des études réalisées sur des modèles d'angiogenèse *in vitro* ont montré que l'expression ectopique de Wnt5a (voie non canonique) affectait aussi le comportement des CE lorsqu'elles forment des réseaux de type capillaire (Masckauchan et al. 2006).

En 2008, Liebner et al. a montré *in vivo* et *in vitro*, lors de l'angiogenèse et de la maturation post-natale des vaisseaux du cerveau, que la signalisation Wnt/ β -caténine confère aux CE leurs propriétés de barrière afin d'induire et de maintenir les caractéristiques de la barrière hématoencéphalique (BHE) (Liebner et al. 2008). Deux membres de la famille Wnt, Wnt7a et Wnt7b, sont impliqués, et agissent sur l'endothélium vasculaire de la BHE via la voie canonique pour promouvoir la formation et la différenciation du réseau vasculaire du système nerveux central (Stenman et al. 2008).

La voie canonique est aussi stimulée dans les CML vasculaires de poumon par le ligand Wnt7b, impliquant les récepteurs Fzd1 et Fzd7 et LRP5 (Wang et al. 2005).

Un rôle de la voie PCP a aussi été montré dans l'angiogenèse, où l'inhibition de la voie entraîne des défauts dans la croissance, la polarité et la migration des CE. Ces effets sont d'ailleurs retrouvés en supprimant Dvl2 par ARN interférence (Cirone et al. 2008).

Enfin, une étude récente met en jeu les 2 signalisations Wnt, canonique et non canonique, et un rôle essentiel de Dvl, dans l'angiogenèse induite par le facteur de la signalisation TGF β , BMP2 (de Jesus Perez et al. 2009).

Ces études impliquent donc les voies canonique et non canonique comme médiateurs des fonctions cellulaires requises lors de l'angiogenèse.

Le laboratoire a exploré l'activité des protéines Fzd dans les CE. Quelques une de ces études seront développées plus en détail dans la partie « résultats ». Le laboratoire a démontré que sFRP1 avait un rôle dans la formation des vaisseaux sanguins (Ezan et al. 2004). Plus récemment, nous avons aussi mis en évidence que la surexpression de sFRP1 augmentait le potentiel angiogénique des cellules souches mésenchymateuses (MSC) et contribuait à la maturation des néo-vaisseaux (Dufourcq et al. 2008). sFRP1 peut réduire la prolifération des CE (Duplaa et al. 1999). Il peut aussi lier Fzd4 et Fzd7, et induire la réorganisation des fibres de stress d'actine dans les CE en activant la GSK3 β (voie canonique) et Rac1 (voie non canonique) (Dufourcq et al. 2008). En 2003, Barandon et al a démontré *in vivo* que la surexpression de sFRP1 diminuait l'accumulation de la β -caténine cytosolique dans les CE, et ce, par l'utilisation de souris transgéniques sur un modèle d'infarctus et d'ischémie du membre inférieur (Barandon et al. 2003).

3. Les gènes cibles de Wnt codant pour des régulateurs angiogéniques

Parmi les nombreux gènes cibles de la voie Wnt/Fzd, on en trouve certains qui sont impliqués dans le développement vasculaire. Tout d'abord, la voie Wnt/ β -caténine régule la transcription de VEGFA (Zhang et al. 2001). Il est régulé positivement dans le cancer du colon où la β -caténine est dérégulée. Les souris présentant un défaut au niveau du gène APC (voie canonique) présentent une dérégulation de la β -caténine et un taux anormal de VEGF (Easwaran et al. 2003). L'expression du gène VEGF serait sous le contrôle de la voie Wnt canonique en conditions physiologiques et pathologiques.

Parmis les autres gènes cibles de Wnt, on trouve l'interleukine-8, une cytokine à activité pro-angiogénique. Elle est activée transcriptionnellement par la signalisation β -caténine/TCF dans les hépatocytes et les HUVEC (Levy et al. 2002).

Les MMP (métalloprotéinases de la matrice) dégradent les composants de la matrice extracellulaire, une fonction qui est essentielle aux mouvements, à la prolifération et à l'assemblage des CE dans les vaisseaux sanguins (Visse et al. 2003). MMP-1 est induite par Wnt-5a via la voie non canonique (Masckauchan et al. 2006).

Ces régulations géniques impliquent la signalisation Wnt/Fzd dans les événements clés de la formation des vaisseaux.

PRESENTATION DES RESULTATS

Partie I : Etude des cellules souches mésenchymateuses dans l'angiogenèse via le système Wnt/Fzd

Cette première partie porte sur le potentiel angiogénique des cellules souches mésenchymateuses (MSC) et sur l'implication du système Wnt/Fzd dans ce processus. Avant d'aborder cette partie, une courte introduction décrivant l'origine et les propriétés des MSC, ainsi que leur potentiel en thérapie cellulaire semble nécessaire.

Les cellules souches mésenchymateuses sont présentes dans divers tissus de l'organisme adulte dont la moelle osseuse. En effet, en plus des cellules souches hématopoïétiques, la moelle osseuse contient des MSC qui sont des cellules souches pluripotentes pouvant se différencier en de nombreux types cellulaires du mésoderme, de l'endoderme et de l'ectoderme ; *in vivo*, elles ont la capacité de migrer vers un organe lésé.

Les maladies ischémiques périphériques sont un grave problème de santé publique. Les MSC apparaissent comme des cellules capables de réparer les dommages ischémiques chez les patients. En effet, il a été montré que les MSC peuvent se différencier en cellules mésenchymateuses (ostéoblastes, chondrocytes), mais aussi en cellules non mésenchymateuses comme les cellules vasculaires (Abedin et al. 2004; Galmiche et al. 1993; Kashiwakura et al. 2003). Les MSC sont recrutées au niveau de sites vasculaires endommagés et participent à leur réparation du fait de leur potentiel angiogénique (Fox et al. 2007). L'utilisation de MSC multipotentes, capables de régénérer des vaisseaux et des tissus endommagés, a été proposée comme une approche thérapeutique prometteuse pour des patients souffrant d'ischémie.

Parmi les différents types de cellules souches, les MSC issues de la moelle osseuse adulte sont attractives pour la thérapie cellulaire. Elles gardent des propriétés de multipotentialité de cellules souches, une faible immunogénicité et une capacité d'expansion *in vitro* (Young et al. 2004). Plusieurs études cliniques ont montré leur efficacité par exemple dans la réparation et la régénération cardiaque (Makino et al. 1999; Shiota et al. 2007). Ces cellules sont potentiellement avantageuses puisqu'elles sont connues pour être moins immunogènes que les autres lignées (Amado et al. 2005).

Cependant, le succès de la thérapie cellulaire se heurte à plusieurs barrières. Tout d'abord, la manipulation de MSC *ex vivo* altère leurs propriétés fonctionnelles et biologiques, amenant à l'accumulation d'altérations génétiques (Miura et al. 2006; Rubio et al. 2005; Wang et al. 2005). De plus, les capacités de différenciation des MSC sont larges, et cette hétérogénéité demeure même une fois les MSC implantées (Breitbach et al. 2007; Yoon et al. 2004). Enfin,

l'efficacité de stratégie de transplantation des MSC est limitée par l'incapacité de maintenir un grand nombre de cellules, après la greffe, dans les sites hypoxiques. En effet, la survie des MSC *in vivo* reste limitée.

Malgré ces problèmes, les MSC représentent actuellement un outil prometteur dans la thérapie cellulaire.

Comment apporter ces cellules sur le site ischémique est également un paramètre important pour le succès de la thérapie cellulaire. Mobilisées à partir du sang périphérique, elles sont recrutées dans les sites d'ischémie pour favoriser la néo-vascularisation. Leurs effets angiogéniques sont mal compris et essentiellement attribués à leur effet paracrine (Kinnaird et al. 2004). Plusieurs études ont suggéré que la signalisation Wnt pouvait jouer un rôle dans le maintien de l'autorégénérescence et la pluripotence des cellules souches hématopoïétiques (Etheridge et al. 2004; Malhotra et al. 2009; Reya et al. 2003; Willert et al. 2003). La signalisation Wnt régule par exemple l'auto-renouvellement des cellules souches épithéliales (Korinek et al. 1998) et hématopoïétiques (Willert et al. 2003). L'activation par Wnt3a module la prolifération et la différenciation des MSC humaines et des cellules mésenchymateuses embryonnaires de souris (De Boer et al. 2004; Derfoul et al. 2004). Récemment, la signalisation Wnt a été impliquée dans l'acquisition des propriétés invasives des MSC humaines (Neth et al. 2007). Enfin, des expériences sur une lignée de cellules souches embryonnaires ont identifié le rôle de sFRP2 dans la différenciation cardiomyogénique (Deb et al. 2008). De plus, une étude récente propose les MSC comme précurseurs vasculaires permettant le recrutement des cellules endothéliales pour former des néo-vaisseaux fonctionnels dans les tissus (Au et al. 2008). Ces données commencent à montrer l'importance de la signalisation Wnt dans la modulation des propriétés de différenciation des cellules souches.

L'étude du potentiel angiogénique des MSC dans l'angiogenèse et de la participation du système Wnt/Fzd dans ce processus a fait l'objet d'un projet annexe auquel j'ai participé durant ma thèse, aboutissant à la publication d'un 1er article, et à la soumission d'un second. Le 1^{er} porte sur l'étude des MSC dans la formation vasculaire et de l'implication du système Wnt/Fzd, et plus particulièrement sFRP1, sur les propriétés angiogéniques de ces cellules (article I). Le 2^{ème} montre les effets de l'hypoxie sur les MSC dans la néo-vascularisation du membre inférieur après ischémie de la patte et le rôle du ligand Wnt4 dans ce processus (article II). Ces deux articles sont résumés ci-dessous.

I. Implication de sFRP1 dans la régulation des propriétés des MSC durant l'angiogenèse

Article I

Secreted frizzled-related protein-1 enhances mesenchymal stem cells function in angiogenesis and contributes to neovessel maturation

Dans le processus de néo-vascularisation, les péricytes recrutés au niveau de la moelle osseuse (De Palma et al. 2005) semblent jouer un rôle majeur dans la stabilité et la fonction des microvaisseaux (Tigges et al. 2008). Une étude a montré que la densité des péricytes avait un impact sur la morphologie des vaisseaux en réponse au VEGF (Abramsson et al. 2003). Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que les MSC, qui présentent des marqueurs de péricytes immatures (Au et al. 2008), pourraient faciliter l'ancrage et le maintien des cellules vasculaires dans les structures vasculaires stables.

Comme nous venons de le décrire, plusieurs études ont montré que la signalisation Wnt/ β -caténine jouait un rôle essentiel dans le devenir des cellules souches. De plus, le laboratoire a montré précédemment que sFRP1, l'antagoniste du système Wnt/Fzd, jouait un rôle sur la formation des vaisseaux sanguins (Ezan et al. 2004). Il agit à une phase tardive durant l'angiogenèse, en induisant une néo-vascularisation dans un modèle d'ischémie de patte. Dans ce processus, sFRP1 active une signalisation dépendante de la GSK3 β impliquant Rac1 dans les CE (Dufourcq et al. 2008) (voir partie « Implication du récepteur Frizzled4 dans la régulation de la morphogenèse vasculaire »). Le but de cette étude a donc tout d'abord été de déterminer si les MSC étaient requises dans le remodelage de la vasculature. Ensuite, nous avons voulu évaluer le rôle angiogénique de sFRP1 sur les MSC dans ce processus.

Dans un modèle de xélogreffe chez la souris, nous avons montré que l'injection de MSC induisait un effet vasculaire bénéfique. Les MSC induisent un recrutement plus rapide des CE au niveau de la matrice (Matrigel®) injectée en sous-cutanée chez la souris. En revanche, les MSC n'intègrent pas la couche endothéliale des vaisseaux primitifs, mais jouent plutôt le rôle de cellules périvasculaires. Elles expriment les marqueurs des péricytes (NG-2) et des CML (α SMA). Les MSC semblent donc se comporter comme des péricytes qui initient et permettent l'établissement de vaisseaux matures.

La surexpression de sFRP1 dans les MSC augmente leurs capacités angiogéniques et artériogéniques. En effet, sFRP1 permet un meilleur recrutement des MSC au niveau des néo-vaisseaux, corrélé à une augmentation de la maturation et de la fonctionnalité vasculaire. Le

blocage de l'activité de GSK3 β abolit l'effet de sFRP1, démontrant le rôle de cette kinase dans la signalisation engendrée par sFRP1 pour promouvoir les propriétés vasculaires des MSC. Les MSC surexprimant sFRP1 sont aussi plus allongées le long des vaisseaux, et présentent un meilleur contact avec le mur vasculaire qui maintient l'intégrité de la couche mésenchymateuse. *In vitro*, des expériences de coculture ont permis de montrer que sFRP1 renforçait les contacts entre les cellules MSC et les CE ou CML, via la β -caténine. Ce résultat montre que les MSC sont capables de mieux communiquer avec les CE ou les CML sous sFRP1, améliorant la stabilité et l'organisation des vaisseaux. De plus, la surexpression de sFRP1 augmente le taux de α SMA dans les MSC, suggérant que sFRP1 renforce la différenciation des MSC en péricytes.

Enfin, *in vitro*, nous avons aussi observé une importante augmentation du taux de PDGF-BB dans les MSC surexprimant sFRP1, sans modulation d'autres gènes pro-angiogéniques comme le VEGF, bFGF, TGF- β . Le PDGF-BB est une voie clé dans la maturation des vaisseaux sanguins. Son induction par sFRP1 pourrait donc participer au recrutement des CML et des péricytes.

Secreted Frizzled-Related Protein-1 Enhances Mesenchymal Stem Cell Function in Angiogenesis and Contributes to Neovessel Maturation

PASCALE DUFOURCQ,^{a,b} BETTY DESCAMPS,^a NANCY FERREIRA TOJAIS,^a LIONEL LEROUX,^{a,c} PIERRE OSES,^{a,c} DANIELE DARET,^a CATHERINE MOREAU,^a JEAN-MARIE DANIEL LAMAZIÈRE,^a THIERRY COUFFINHAL,^{a,c} CÉCILE DUPLÀA^a

^aInstitut National de la Santé et de la Recherche Médicale U828, Université Victor Ségalen, Bordeaux2, Pessac, France; ^bBiochemistry Laboratory, UFR Sciences Pharmaceutiques, Université Victor Ségalen, Bordeaux, France; ^cDepartment of Cardiology, Pole Cardiothoracique, Hôpital Haut Lévêque, Pessac, France

Key Words. Angiogenesis • Cellular therapy • Pericytes • Mesenchymal stem cell

ABSTRACT

Mesenchymal stem cell (MSC) transplantation offers a great angiogenic opportunity in vascular regenerative medicine. The canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway has been demonstrated to play an essential role in stem cell fate. Recently, genetic studies have implicated the Wnt/Frizzled (Fz) molecular pathway, namely Wnt7B and Fz4, in blood growth regulation. Here, we investigated whether MSC could be required in shaping a functional vasculature and whether secreted Frizzled-related protein-1 (sFRP1), a modulator of the Wnt/Fz pathway, could modify MSC capacities, endowing MSC to increase vessel maturation. In the engraftment model, we show that murine bone marrow-derived MSC induced a beneficial vascular effect through a direct cellular contribution to vascular cells. MSC quickly organized into primitive immature vessel tubes connected to host circulation; this organization preceded host endothelial cell (EC) and smooth muscle cell (SMC) recruitment to later

form mature neovessel. MSC sustained neovessel organization and maturation. We report here that sFRP1 forced expression enhanced MSC surrounding neovessel, which was correlated with an increase in vessel maturation and functionality. *In vitro*, sFRP1 strongly increased platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) expression in MSC and enhanced β -catenin-dependent cell-cell contacts between MSC themselves and EC or SMC. *In vivo*, sFRP1 increased their functional integration around neovessels and vessel maturation through a glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3 β)-dependent pathway. sFRP1-overexpressing MSC compared with control MSC were well elongated and in a closer contact with the vascular wall, conditions required to achieve an organized mature vessel wall. We propose that genetically modifying MSC to overexpress sFRP1 may be potentially effective in promoting therapeutic angiogenesis/arteriogenesis processes. *STEM CELLS* 2008;26:2991–3001

Disclosure of potential conflicts of interest is found at the end of this article.

INTRODUCTION

Cell therapy and therapeutic angiogenesis are expected to be used in combination with conventional therapies in patients with ischemic cardiovascular diseases. Current approaches imply that mesenchymal stem cells (MSC) may provide angiogenic benefits [1–3]. MSC can be isolated from bone marrow, harbor expansion potential, and can differentiate not only into mesenchymal cells, such as osteoblasts and chondrocytes [4], but also into nonmesenchymal cells, such as vascular cells [5–7]. They have also been exploited in tissue-engineered vascular autografts and heart valves [8, 9]. Under conditions of stress, endocrine signals, released from injured tissue, act to mobilize multipotent MSC from the bone marrow. MSC are then recruited to the damage site for repair and angiogenesis [10]. These features make MSC an attractive therapeutic tool.

Current research indicates that MSC may provide an angiogenic benefit because of their potential to be recruited during arteriogenesis and vascular repair [6, 11], but the mechanism by which these cells enhance neo-vascularization remains unclear. Various studies have shown that bone marrow-derived cells incorporate into newly formed capillaries [1]; however, the absolute number of incorporated and differentiated vascular progenitors varies greatly [12, 13]. Other authors speculate that paracrine effects are responsible for the proangiogenic effect of MSC [14–17]. The difficulty in interpretation of their role could be linked to the diversity of mesenchymal cell types recruited *in situ* and to the elusive nature of the paracrine signals that are exchanged between MSC and vascular cells.

A major role was attributed to bone marrow-recruited pericytes [18–20] in microvascular stability and function [21]. Previous studies have demonstrated the role of these cells in distinct vessel formation steps, such as elongation, vascular remodeling,

Author contributions: P.D.: data analysis and interpretation, conception and design, collection and assembly of data, manuscript writing; B.D., N.F.T., L.L., P.O., and C.M.: data analysis and interpretation; D.D.: collection and assembly of data; J.-M.D.L. and T.C.: manuscript writing; C.D.: conception and design, manuscript writing.

Correspondence: Pascale Dufourcq, Ph.D., Inserm U828, Avenue du Haut Lévêque, 33600 Pessac, France. Telephone: 33557891972; Fax: 3356368979; e-mail: pascale.dufourcq@biophar.u-bordeaux2.fr Received April 14, 2008; accepted for publication August 12, 2008; first published online in *STEM CELLS EXPRESS* August 28, 2008. ©AlphaMed Press 1066-5099/2008/\$30.00/0 doi: 10.1634/stemcells.2008-0372

STEM CELLS 2008;26:2991–3001 www.StemCells.com

and maturation of blood vessels [22–24]. Furthermore, pericyte density was shown to have an impact on vessel morphology in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) [25]. In this regard, we hypothesized that MSC, which express immature pericyte markers [26], could facilitate the anchoring and the maintenance of vascular cells into stable vascular structures. Further development of this concept requires further insight into the mechanisms of MSC maintenance on neovessels. The canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway has been found to play an essential role in stem cell fate [27–29]. We have previously demonstrated that secreted Frizzled-related protein-1 (sFRP1), a modulator of Wnt/Frizzled (Fz) pathway, has a role in blood vessel formation [30]. Recently, we showed that sFRP1 acts at a later stage, inducing vessel formation in a hind limb ischemia model, and that sFRP1 is able to activate a glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3 β)-dependent pathway involving Rac1 in endothelial cells [31].

Here, we performed a variety of studies to determine whether MSC could be required in shaping a functional vasculature and whether MSC genetically modified to overexpress sFRP1 would have an enhanced angiogenesis/arteriogenesis capacity compared with control MSC. In a model of xenograft, we assessed the ability of MSC to stimulate angiogenesis. Our study demonstrates that implanted MSC form a primitive vessel-like network that precedes endothelial cell (EC) recruitment. The cells did not differentiate in EC but were consistently recruited as mural cells. We then analyzed the role of sFRP1 on the MSC functional vascular plasticity and showed that forced expression of sFRP1 enhanced MSC organization and differentiation and that this step was a determinant for vessel maturation and stability.

MATERIALS AND METHODS

Harvest and Culture Expansion of Murine MSC

MSC were isolated and cultured as previously described [32, 33]. Briefly, mouse bone marrow mononuclear cells purified by Ficoll Paque (Amersham Biosciences, Orsay, France, <http://www.amersham.com>) were resuspended and seeded at a density of 1×10^6 cells per cm^2 and cultured in McCoy's medium with 10% BFS and 10% horse serum (Invitrogen). Five to 7 days later, the nonadherent hematopoietic cells were discarded. The attached cells grew and developed colonies in 15–30 days. Colonies were then subcloned and reseeded in McCoy's medium with 20% serum. Five selected clones were amplified more than eight times prior to their characterization and further use. These clones displayed all the same phenotypic characteristics.

In Vitro MSC Characterization

Immunostaining. Immunostaining was performed as previously described [33, 34]. Cells were fixed with 2% paraformaldehyde (PFA) for 10 minutes and permeabilized with 0.2% Triton X-100 for 2 minutes. After saturation in 5% bovine serum albumin for 1 hour, cells were incubated with primary antibodies against CD31, CD45 (BD Pharmingen, San Diego, <http://wwwbdbiosciences.com>), VE-cadherin, cKit, Thy1, Endoglin (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, <http://www.scbt.com>), CD34, CD4 (AbD Serotec, Raleigh, NC, <http://www.ab-direct.com>), CD3, Sca-1 (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, <http://www.bd.com>), nerve glial antigen 2 (NG-2) (Chemicon, Temecula, CA, <http://www.chemicon.com>), and α -smooth muscle actin (SMA; Sigma-Aldrich, St. Louis, <http://www.sigmaaldrich.com>). Biotinylated secondary antibodies anti-rabbit IgG, anti-mouse IgG (Amersham Biosciences), and anti-goat IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, <http://www.jacksonimmuno.com>) were incubated for 1 hour followed by either streptavidin-fluorescein isothiocyanate or Alexa Fluor 568 complex (Molecular Probes, Eugene, OR, <http://probes.invitrogen.com>).

Real-Time Polymerase Chain Reaction Analysis. Total RNA was isolated using Tri Reagent (Euromedex, Souffelweyersheim, France, <http://www.euromedex.com>) and DNase (Promega, Madison, WI, <http://www.promega.com>) treatment according to the manufacturers' instructions. One microgram of total RNA was reverse-transcribed using M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) as previously described [31]. Polymerase chain reaction (PCR) was done using IQ SYBR Green supermix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, <http://www.bio-rad.com>). An MJ Research Opticon (Bio-Rad Laboratories) and the following parameters were used for real-time PCR: 95°C for 5 minutes followed by 35 cycles of 95°C for 15 seconds, 60°C for 20 seconds, and 72°C for 15 seconds. All experiments were done in triplicate. Negative controls without reverse transcription (RT) were prepared in parallel for each RNA sample. Primer sequences were as described in supplemental online Table 1. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase was used as endogenous reference, and normalizations were calculated using the $\Delta\Delta C_T$ method. To compare expression patterns in MSC with those of commonly expressed in EC or smooth muscle cells (SMC), RNA was extracted from confluent EC line MS1 or mouse SMC from media aorta. MSC transcripts are expressed as a percentage of remaining gene expression method (supplemental online Table 2).

MSC Transduction with Lentivirus

Cultured MSC were transduced with lentivirus encoding enhanced green fluorescent protein (eGFP) (pMND-eGFP lentivirus from the Trono laboratory) by replacing the medium with fresh medium containing viral supernatant and incubating for 3 hours at 37°C. Transgene stability was verified after each passage and remaining stable throughout the passages.

Recombinant Adenovirus Infection

Green fluorescent protein (GFP)-MSC were infected at a multiplicity of infection of 100 for 2 hours with adenoviral vectors expressing either β -galactosidase (Ad β gal), sFRP1 (AdFrzA) [31], or catalytically inactive forms of GSK3 β (Ad GSK3 β -KM; kindly provided by Dr. K. Walsh) [35]. Recombinant adenoviral stocks were generated and provided by the vector core of the University Hospital of Nantes (Nantes, France) [36].

Overexpression was verified by Western blot analysis. MSC were lysed for 5 minutes in RIPA buffer (1% Nonidet P-40, 0.5% deoxycholate, 0.1% SDS, 50 mM Tris, pH 8.0, 1 mM aprotinin, 1 mM AEBSF, 1 mM benzamide, 1 mM orthovanadate). Fifty milligrams of protein, quantified by bicinchoninic acid assay (Pierce, Rockford, IL, <http://www.piercenet.com>), was separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred onto polyvinylidene difluoride membranes (Millipore, Billerica, MA, <http://www.millipore.com>). Membranes were incubated with antibodies against α -tubulin (Sigma-Aldrich), hemagglutinin A (HA) (12CA5; Roche Diagnostics, Basel, Switzerland, <http://www.roche-applied-science.com>), sFRP1 (sc7425; Santa Cruz Biotechnology), and β -galactosidase (AB1211; Chemicon), which were revealed with enhanced chemiluminescence (Amersham Biosciences). Relative protein levels were quantified using Scion software (Scion Corporation, Frederick, MD, <http://www.scioncorp.com>) on scanned films. Modified MSC were used in the Matrigel (BD Biosciences, San Diego, <http://wwwbdbiosciences.com>) assay 2 days after adenovirus infection.

Murine Matrigel Assay and Cell Transplantation

Matrigel (0.25 ml) was mixed with fibroblast growth factor 2 (FGF2; 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Sigma-Aldrich) at 4°C and injected subcutaneously into the abdomen of 8-week-old male nude mice (RAG2/ γ ; 10 animals per group) [37]. Mice were injected with cold Matrigel alone or Matrigel mixed with GFP-MSC (0.5×10^6). To stain the functional microvasculature, some mice were perfused with biotin-conjugated lectin (0.5 mg/ml; Vector Laboratories, Burlingame, CA, <http://www.vectorlabs.com>) 10 minutes before the sacrifice. The animals were sacrificed with an overdose of sodium pentobarbital 5, 9, and 13 days and 3 months after the injection. This study was conducted in accordance with both institutional guidelines and

those in force in the European Community for experimental animal use (L358-86/609/EEC).

Tissue Processing, Histology, and Microscopy

Plugs were fixed in 4% PFA and embedded in paraffin. Five-micrometer paraffin-embedded sections cut transversely from the mouse plug and abdominal muscle. The following antibodies were used: CD31 (BMA Biomedicals, Auggs, Switzerland, <http://www.bma.ch>), SMA (Sigma-Aldrich), NG-2 (Chemicon), smooth muscle-myosin heavy chain (SM-MHC; Biomedical Technologies Inc.), and GFP (Invitrogen). For biotinylated lectin staining, sections were incubated for 1 hour with streptavidin-conjugated Alexa Fluor dye. Capillary densities and functional vessels were examined by counting the number of capillaries stained with anti-CD31 or with lectin, respectively. The percentage of mature vessels (arterioles) was quantified after double staining for CD31 and SM-MHC. The number of MSC recruited around neovessel and into arterioles was assessed after double staining for CD31 and GFP or SM-MHC and GFP, respectively. A minimum of 30 randomized pictures were recorded at a magnification of $\times 20$ for each animal at each time point. Positive cells were counted on captured images, and the data were analyzed with Sigma Plot software (Sigma Plot, Integral Software, Paris, <http://www.sigmaplot.com>). For confocal microscopy, sections were analyzed with a Nikon laser scanning confocal microscope using multichannel scanning (Nikon PCM 2000), $\times 60/1.4$ ApoPlan oil immersion objective and EZ200 software (Nikon, Tokyo, <http://www.nikon.com>). Single *xy* scans had an optical slice thickness of $0.4 \mu\text{m}$. Three-dimensional projections were digitally reconstituted from stacks of confocal optical slices by Imaris software (Bitplane, Zurich, Switzerland, <http://www.bitplane.com>).

Analysis of Wnt/Fz Pathway in MSC In Vitro

RT-PCR. Total RNA was isolated from confluent MSC as described above, and RT-PCR was performed as described previously [31], using primer sequences listed in supplemental online Table 1.

Reporter Gene Assay. Transfections were carried out using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions [31]. For TOPFLASH reporter assays, MSC were transfected in 24-well plates at 2×10^5 cells per cm^2 with Super8XTOPFLASH luciferase reporter plasmid (375 ng/well) containing LEF/TCF consensus binding sites (Randal T. Moon laboratory). pRL-CMV (Promega) was cotransfected (90 ng per well) to normalize samples for transfection efficiency (Dual luciferase kit; Promega). After 24 hours, MSC were treated either with LiCl (10 nM; Sigma-Aldrich) or with conditioned media obtained from CHO cells transfected with a plasmid harboring *WNT1* (kindly provided by Randal T. Moon). MSC were harvested 24 hours later, and luciferase activity was determined with a Turner Designs luminometer (Turner Designs, Sunnyvale, CA, <http://www.turnerdesigns.com>). Data are means \pm SD of triplicate well measurements for one representative experiment.

sFRP1 Activation In Vitro

MSC were incubated with or without recombinant bovine (rb) sFRP1 (10 nmol/l) in MSC medium. Total RNA was extracted after 4 days, and quantification of MSC expression was realized by quantitative RT-PCR as described above. Normalizations and fold changes were calculated using the $\Delta\Delta C_T$ method. For protein expression, cells were lysed and Western blot analysis was performed using antibody anti- α -actin and anti- α -tubulin as describe above.

For coculture experiments, rat SMC, isolated from rat aorta, and MS1 (a mouse pancreatic EC line; American Type Culture Collection, Manassas, VA, <http://www.atcc.org>) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium with 5% BFS. The mixed cells (1:1), GFP-MSC plus MS1 or SMC, were cultured on chamber slides (Labtek-II system; Nalge Nunc International, Rochester, NY, <http://www.nalgenunc.com>) and incubated or not with rb sFRP1. Forty-eight hours later, the cells were fixed with 2% PFA for 10 minutes and permeabilized with 0.2% Triton X-100 for 2 minutes. To investigate cell-cell junctions, staining for β -catenin was performed with antibody anti- β -catenin (Sigma-Aldrich) followed by second antibody conjugated with Alexa 568 (Molecular Probes). Finally,

cells were mounted in Vectashield mounting medium containing 4,6-diamidino-2-phenylindole (Vector Laboratories). The chamber slides were analyzed with a Zeiss microscope (Axio Observer Z) using a $\times 40$ or $\times 63/1.4$ ApoPlan oil immersion objective and AxioVision software (Carl Zeiss, Jena, Germany, <http://www.zeiss.com>) or with a confocal microscope (Nikon PCM 2000).

Statistical Analysis

Results are expressed as mean \pm SD. All analyses were performed with appropriate software (Statview 5-1; Abacus, Grand Rapids, MI, <http://www.abacuspub.com>). Comparison of continuous variables between two groups was performed by a one-way analysis of variance and subsequently, if statistical significance was observed, by a two-sided paired *t* test. A value of $p < .05$ was considered significant.

RESULTS

Characterization of Cultured MSC

Immunofluorescence labeling and RT-PCR analyses were performed to characterize murine MSC (supplemental online Fig. 1; supplemental online Table 2). As we described previously [33], immunolabeling experiments showed that MSC express Thy1, Sca1, and cKit (supplemental online Table 2). At the protein level, MSC expressed α -actin and NG-2 pericyte markers (supplemental online Fig. 1). By quantitative RT-PCR, we compared gene expression in MSC with that in murine SMC. MSC expressed 132% of α -actin, 3% of Sm22, and 331% of platelet-derived growth factor receptor beta (PDGF-R β) compared with SMC (supplemental online Table 2). MSC did not express endothelial cell markers, such as CD31, VE-Cadherin, Tie2, or Flk, and expressed low levels of Flt1 and CD34. Moreover, MSC were devoid of the hematopoietic markers (CD45, CD3) (supplemental online Table 2). This pattern was stable on expanded MSC from 8 to 25 passages.

Angiogenic Effect of MSC in a Xenograft Model

To investigate the functional consequence of the presence of MSC on angiogenesis, we used a xenograft model in which MSC were embedded in a Matrigel matrix and injected subcutaneously into nude mice. We compared the kinetics of host vessel invasion into the Matrigel when MSC were transplanted or not. To track the MSC *in vivo*, they were transduced with a lentiviral vector harboring the gene encoding green fluorescent protein (GFP-MSC). GFP+ MSC were consistently detected throughout the course of the kinetics (Fig. 1) until 3 months after Matrigel implantation (supplemental online Fig. 3), demonstrating that MSC engraftment was stable for the long term.

We showed that MSC accelerated host vessel growth into the Matrigel. Five days after *in vivo* injection, control plug (i.e., Matrigel alone) was avascular (Fig. 1A, 1B), whereas we consistently observed a high number of CD31-positive endothelial cells at the periphery of the plug containing the Matrigel plus MSC (Fig. 1C, 1D). At day 9 (D9), in Matrigel alone (Fig. 1E, 1F), sparse blood vessels began to be detected at the periphery of the plug, but the major part of the plug remained avascular. In contrast, in the MSC-Matrigel implant, a strong angiogenic response occurred throughout the plug (Fig. 1G, 1H). At 13 days, in Matrigel alone and in Matrigel containing MSC (Fig. 1I–1L), CD31-positive neovessels were detected homogeneously throughout the plugs. Finally, we looked at the vessel maturation after double staining for CD31 and SM-MHC, a marker of differentiated SMC. The maturation of neovessels was delayed, as no SM-MHC-positive cells were detected before D9. At D13 we observed that approximately 20% of the

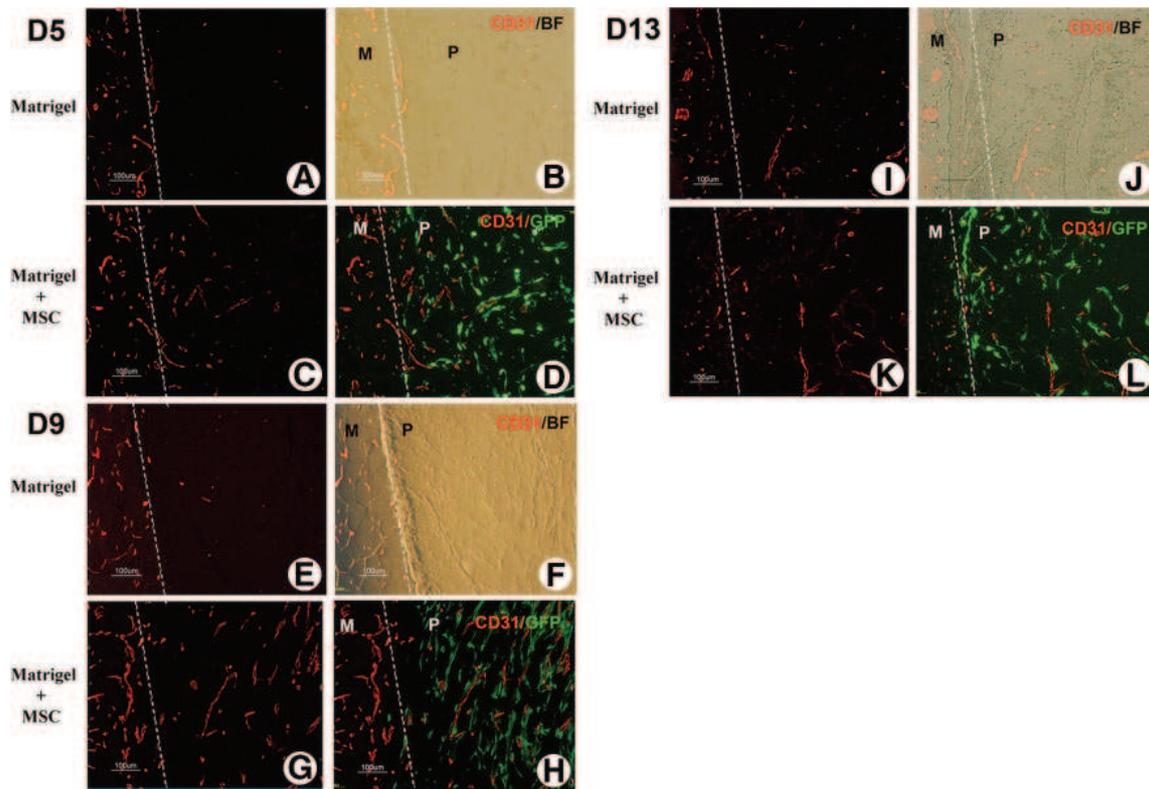


Figure 1. A strong angiogenic response was induced by MSC in a murine Matrigel plug assay. Matrigel alone or Matrigel with GFP-MSC Ps was extracted at days 5 (A–D), 9 (E–H), and 13 (I–L) and analyzed by immunostaining for CD31 (red). MSC were labeled with anti-GFP antibody (green). To localize plug structure and abdominal muscle in the Matrigel group, BF was merged with CD31 (CD31/BF). Dotted lines show borders between abdominal muscle and injected plug. Abbreviations: BF, bright-field; GFP, green fluorescent protein; M, muscle; MSC, mesenchymal stem cell; P, plug.

vessels contained SM-MHC-positive mural cells, revealing a late recruitment of SMC.

MSC Localization and Differentiation

GFP distribution in the Matrigel plug revealed that MSC formed primitive vessel-like tubes at D5 (Fig. 2Aa, 2Ab). MSC were aggregated into a network of elongated multicellular tubes containing red blood cells, evidenced by alizarin staining (Fig. 2Ab). These primitive MSC forming tube structures were observed even in CD31-negative areas in the middle of the plug (Fig. 2Ac, 2Ad). At this time point, immature CD34⁺ EC were not observed in the lumen of these primitive vascular structures (supplemental online Fig. 2). However, GFP⁺ cells expressed low levels of CD34. At day 13, as the angiogenic process progressed, in more than half of the vessels, CD31 was associated with GFP, suggesting a large recruitment of CD31-positive cells in tube-forming MSC (Fig. 2B).

To analyze the phenotype of MSC *in vivo*, multichannel laser scanning confocal microscopy, after labeling for EC (CD31), mural cells (NG-2 and SMA), or differentiated SMC (SM-MHC), was performed (Fig. 2C). GFP-positive MSC formed clusters that were in close contact with the EC. However, no double-labeled CD31/GFP-positive cells were observed on day 5, 9, or 13 (Fig. 2Ca). MSC did not differentiate into EC, but the shape, localization, and morphology of the GFP-positive cells suggested that they behaved as pericytes. Indeed, all the GFP-positive MSC in the plug expressed both SMA and NG-2 (the latter is reported to be a marker of less mature pericytes) but remained SM-MHC-negative (Fig. 2Cb–2Cd). We evaluated the late MSC contribution in Matrigel plugs obtained 3 months post-transplantation. At 3 months, the MSC phenotype remained

stable (CD31[−], SM-MHC[−], SMA⁺) and MSC were localized as perivascular cells (supplemental online Fig. 3). It is interesting to note that 3 months after transplantation, we observed that only a small percentage (0.05%) of vessels coexpressed CD31 and GFP, suggesting that under some conditions, MSC have the ability to differentiate into EC. This differentiation was very rare and could not have accounted for the strong MSC-induced angiogenic response.

The sequence of these events led to the suggestion that MSC could form primitive vessel-like structures connected to host blood circulation. Next, these immature MSC tubes recruit first host EC and later mural cells to form mature multilayer vessels throughout the plug. MSC participate in neovessel formation and organization as mural cells stabilizing the neovessel.

Increased sFRP1 Expression in MSC Promotes Vessel Maturation *In Vivo*

Among many molecular players involved in stem cell regulation, the Wnt pathway is one of the core sets of conserved signaling pathways that regulate many aspects of stem cell fate. To determine a possible contribution for the Wnt/Frizzled pathway in the promotion of the MSC-enhanced angiogenesis, we first evaluated the expression of several components of this pathway in MSC. RT-PCR analysis showed that MSC expressed Fz1–Fz6 and sFRP1, a regulator of the Wnt pathway (Fig. 3A). We demonstrated using a β -catenin reporter TOP-Flash assay that the Wnt canonical signaling is active in MSC. Treatment with either LiCl, a Wnt mimetic, or Wnt1-containing conditioned medium strongly induced luciferase activities in MSC (Fig. 3B).

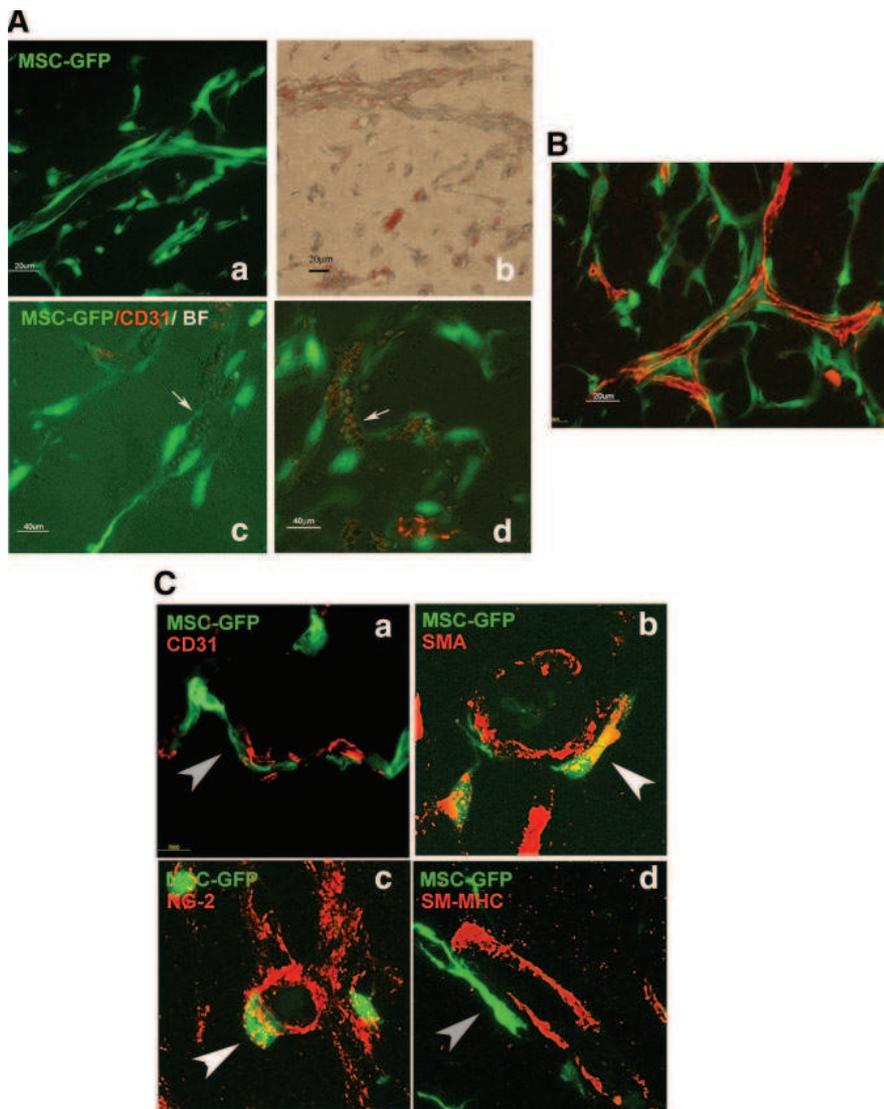


Figure 2. MSC were organized into primitive tube structures and were recruited as pericytes around neovessels. (A): At day 5, GFP-MSC (green) were organized in the plug and formed primitive tubular structures (Aa, Ab). Alizarin staining (labeling of red blood cells) showed that these tubes were filled with red blood cells (Ab), and alizarin staining was observed in the plug even in the CD31-negative zone. Vessel-like structures were analyzed after GFP staining (green), CD31 staining (red), and BF observations (Ac, Ad). Arrows in (Ac) and (Ad) indicate GFP-positive/CD31-negative tubes containing red blood cells. (B): Double immunofluorescence analysis after GFP and CD31 staining of plug sections containing GFP-MSC at days 13. (C): Representative confocal micrographs of plug sections containing GFP-MSC after double staining for GFP (green) and for CD31 (Ca), SMA (Cb), NG-2 (Cc), or SM-MHC (Cd) (red) at a magnification of $\times 63$. z-Stack confocal images showed that GFP colocalized with neither CD31 nor SM-MHC labeling. In contrast, GFP-positive MSC were SMA- and NG-2-positive. MSC staining with GFP is indicated by arrowheads. Abbreviations: BF, bright-field; GFP, green fluorescent protein; MSC, mesenchymal stem cell; SMA, α -smooth muscle actin; SM-MHC, smooth muscle-myosin heavy chain.

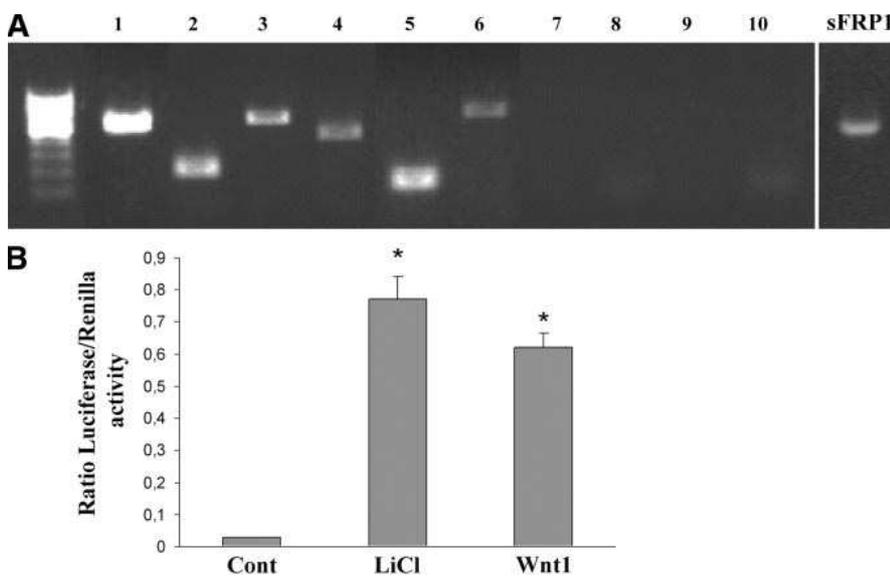


Figure 3. Expression of the components of the Wnt/Fz pathway by mesenchymal stem cells (MSC). (A): Reverse transcription-polymerase chain reaction analysis shows Frizzled receptor and sFRP1 expression in confluent MSC. (B): MSC were transfected with Top-Flash along with pRL-CMV and treated with Cont medium, Wnt1-conditioned medium, or LiCl. At 24 hours post-transfection, luciferase assay was performed as described in Materials and Methods, and the relative levels of luciferase activity were normalized to levels of luciferase activity of the *Renilla* Cont plasmid. Data represent the mean \pm SD of three experiments. Abbreviations: Cont, control; sFRP1, secreted Frizzled-related protein-1.

In this study, given the previously reported role of sFRP1 in angiogenesis, we examined whether sFRP1 could act instructively in MSC to modify neovessel formation. GFP-MSC were

transduced with adenoviruses harboring genes allowing expression of *sFRP1* or *LacZ* with more than 90% efficiency (data not shown). The increase in sFRP1 was on average 10 times higher

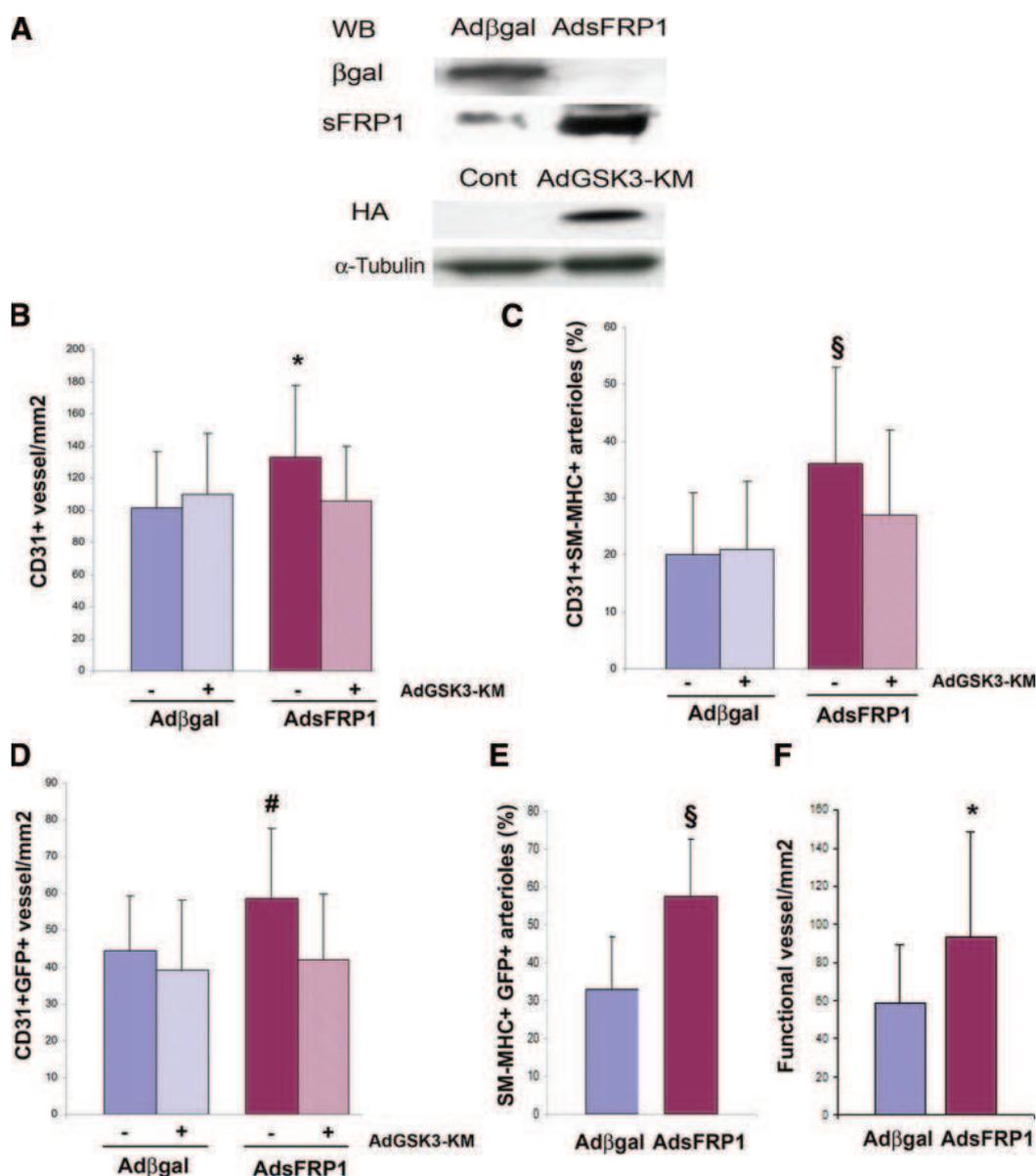


Figure 4. Overexpression of sFRP1 improved vessel density and arteriole formation. (A): Mesenchymal stem cells (MSC) were infected with Ad to overexpress negative Cont gene *LacZ* (Adβgal), *sFRP1* (AdsFRP1), or HA-tagged inactivated forms of GSK3β (AdGSK3β-KM) as evaluated by Western blot using anti-βgal, anti-sFRP1, and anti-HA antibodies, respectively. Effects of MSC overexpressing sFRP1 were evaluated at day 13 on capillary density (number of CD31 vessels per mm²) (B), the percentage of arterioles (CD31+SM-MHC+ arterioles per total vessels in each condition) (C), GFP-MSC recruitment around CD31+ neovessels (number of CD31+GFP+ vessels per mm²) (D), GFP-MSC recruitment into arterioles (percentage of SM-MHC+GFP+ arterioles) (E), and functional vessels (lectin+ vessels per mm²) (F); *, $p < .05$; #, $p < .001$; §, $p < .0001$; $n = 30$. An average of five independent plugs per group were analyzed, and experiments were repeated twice, with two independent sets of MSC. Abbreviations: βgal, β-galactosidase; Ad, adenovirus; Cont, control; GFP, green fluorescent protein; sFRP1, secreted Frizzled-related protein-1; SM-MHC, smooth muscle-myosin heavy chain; WB, Western blot.

in AdsFRP1-MSC than in AdLacZ-MSC (Fig. 4A). We assessed the angiogenic effect of sFRP1 overexpression in vivo by injecting AdsFRP1-MSC or AdLacZ-MSC with Matrigel. At day 13, we observed that injection of sFRP1-MSC resulted in a 31% increase in neovessel number in the plug compared with control MSC (133 ± 45 vs. 101 ± 35 CD31+ vessels per mm²; $p < .01$; Fig. 4B). This increase in vessel density was associated with a major increase in vessel maturation, evaluated by double staining for CD31 and SM-MHC. In the control group, CD31+SM-MHC+ arterioles represented $20 \pm 11\%$ of total vessels, whereas in AdsFRP1-MSC, $36 \pm 17\%$ of vessel were arterioles ($p < .0001$; Fig. 4C). To determine MSC incorporation into vascular structure, CD31+GFP+ and SM-

MHC+GFP+ structures were quantified. As observed in Figure 4D, the number of capillaries covered with GFP-MSC were significantly increased in the sFRP1-MSC group (59 ± 19 vs. 44 ± 15 CD31/GFP-positive vessels per mm²; $p < .005$; Fig. 4D). Notably, sFRP1 overexpression resulted in a greater increase of SM-MHC+GFP+ arterioles compared with control ($57.5\% \pm 15\%$ vs. $33\% \pm 14\%$; $p < .0001$; Fig. 4E). To study whether sFRP1 increased blood perfusion in the plug, lectin was then injected before sacrifice (Fig. 3F). Overexpression of sFRP1 significantly increased functional vessels, as assessed by the increase of lectin-positive structures in AdsFRP1-MSC plug compared with Adβgal-MSC (93 ± 55 vs. 59 ± 30 lectin+/mm²; $p < .01$). These findings demonstrate that MSC geneti-

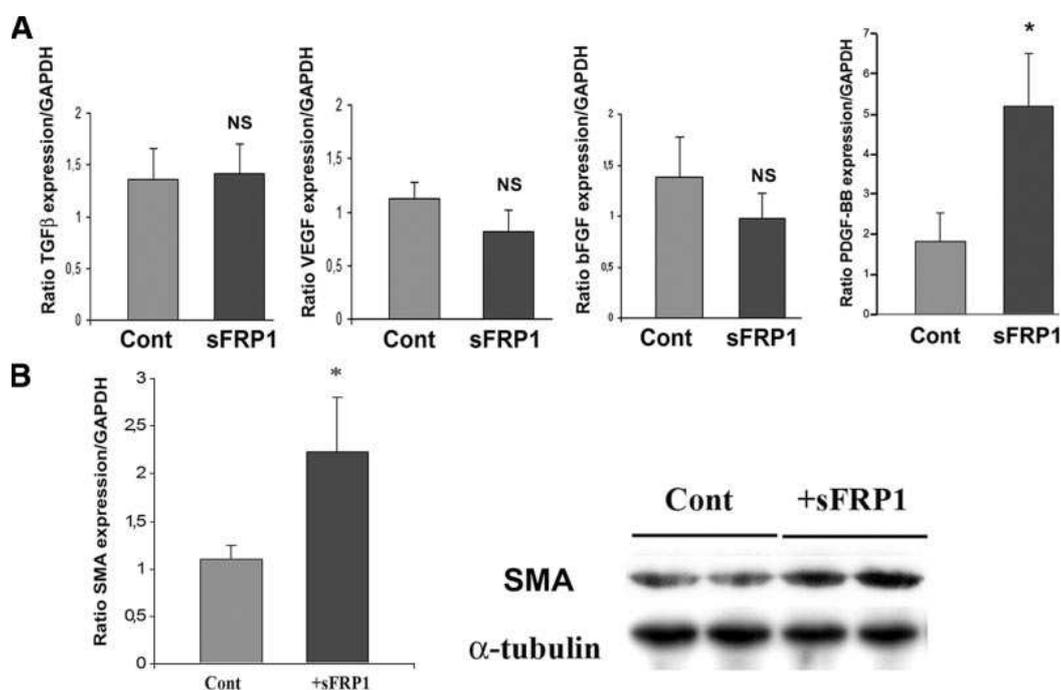


Figure 5. Growth factor expressions by mesenchymal stem cells (MSC) under sFRP1 activation. (A): MSC were treated with either Cont medium or with recombinant bovine (rb) sFRP1 for 4 days. Expression of TGF β , VEGF, FGF2, and PDGF-B was determined by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) in MSC under sFRP1 treatment. Vertical axes show relative expression normalized to *GAPDH*. $n = 3$; *, $p < .001$. (B): SMA expression was analyzed in MSC treated or not treated with rb sFRP1, either by quantitative RT-PCR or by Western blot using an anti-SMA antibody. rb sFRP1 treatment induced an increase in SMA expression in MSC; *, $p < .001$; $n = 3$. Illustrated blot is representative of five experiments. Abbreviations: bFGF, basic fibroblast growth factor; Cont, control; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; NS, not significant; PDGF, platelet-derived growth factor; sFRP1, secreted Frizzled-related protein-1; SMA, α -smooth muscle actin; TGF β , transforming growth factor; VEGF, vascular endothelial growth factor.

cally enhanced to overexpress sFRP1 have an angiogenic/arteriogenic potency superior to that of control MSC.

sFRP1-Induced Vessel Maturation Is GSK3 β -Dependent

As we have previously demonstrated that GSK3 β is a downstream target of sFRP1 in EC [31], we tested in vivo the relevance of the GSK3 β -dependent signaling cascade activation by sFRP1 in MSC. MSC were coinfecting with or without adenovirus encoding the inactivated form of GSK3 β (AdGSK3-KM) (Fig. 4A) [38]. This overexpression of GSK3-KM in sFRP1-MSC inhibited sFRP1-induced angiogenic effects (Fig. 4B–4D), demonstrating that exogenous sFRP1 instructs MSC in following a GSK3 β -dependent pathway to mediate vascular cell recruitment. It should be noted that inhibition of GSK3 β kinase in MSC did not alter their basal angiogenic effect, suggesting that endogenous sFRP1 expression in MSC is not required for the initial MSC-induced angiogenic step.

sFRP1 Increased PDGF-BB and SMA Expression in Cultured MSC

MSC expressed major angiogenic factors such as VEGF, FGF2, transforming growth factor β (TGF β), PDGF-BB, and angiopoietin 2 (supplemental online Table 2). As published reports have demonstrated a crucial role of PDGF-BB in vessel maturation [39], we analyzed by quantitative PCR whether sFRP1 could modulate PDGF-B expression in MSC. In vitro, treatment of MSC with rb sFRP1 for 4 days resulted in an increase of ~5-fold in PDGF-B transcripts compared with control untreated MSC (Fig. 5; $n = 3$; $p < .001$). PDGF-B induction by sFRP1 was not observed in cultured EC (data not shown). In contrast, no consistent expression changes of TGF β , FGF2, and VEGF

levels were observed in response to sFRP1 activation by real-time quantitative PCR (Fig. 5). We analyzed the impact of sFRP1 on α -actin expression (SMA), a mural cell marker. sFRP1 treatment induced a twofold increase of SMA mRNA levels by quantitative PCR in MSC compared with the control (Fig. 5B; $n = 3$; $p < .001$). The same increase was observed at the protein level in Western blots (Fig. 5B). However, under sFRP1 activation, MSC did not acquire differentiated SMC markers, such as SM-MHC (data not shown).

sFRP1 Reinforces Homotypic and Heterotypic Cell-Cell Junctions

Treatment of cultured MSC with recombinant sFRP1 resulted in remarkable morphological changes in vitro (Fig. 6A); MSC exhibited an elongated, polygonal shape with reorganized stress fibers (data not shown). Confocal microscopy revealed a relocalization of β -catenin under sFRP1 treatment into cell-cell junctions. β -Catenin expression clearly delimited cell-cell junctions in sFRP1-treated cells compared with the control, where β -catenin was observed more sparsely and appeared patchy at the cell membrane (Fig. 6A).

To better understand the crosstalk between MSC and vascular cells, in vitro coculture experiments were performed. Immunofluorescence analysis revealed that MSC were able to engage adhesion contact structures with SMC and EC, as evidenced by a strong expression of β -catenin at cell-cell junctions between MSC and EC, or MSC and SMC (Fig. 6Ba, 6Bb). When the cells were treated with sFRP1, an increase in β -catenin labeling was observed in MSC-EC (Fig. 6Bc) and MSC-SMC (Fig. 6Bd) coculture compared with control, suggesting that sFRP1 could increase MSC junctions with other cells.

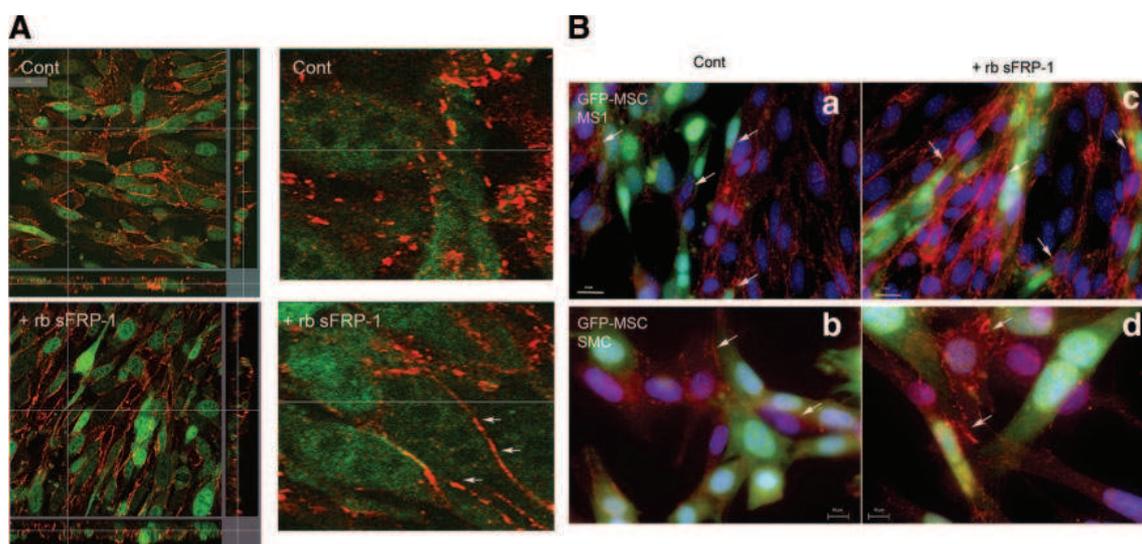


Figure 6. sFRP1 modified MSC morphology and increased β -catenin staining in homotypic and heterotypic cell-cell junction. **(A):** MSC were cultured in the presence of rb sFRP1 for 3 days, fixed, and stained with anti- β -catenin antibody (red). Images of MSC expressing GFP fluorescence (green) were analyzed by confocal microscopy. Left panels show z -stack confocal images (magnification, $\times 63$); right panels show merged images, zoomed to area of interest. rb sFRP1 promoted the reorganization of MSC with a more longitudinal arrangement than Cont conditions and a relocalization of β -catenin labeling all along MSC membranes in cell-cell junctions (white arrows). Images of MSC with or without sFRP1 treatment are representative of three experiments. **(B):** MSC were cocultured with endothelial cells or with SMC for 48 hours, with **(Bc, Bd)** or without **(Ba, Bb)** rb sFRP1. Cells were fixed and stained for GFP (localization of MSC, green), β -catenin (red), and nuclei (blue). MSC interacted with both cell types through β -catenin cell-cell junctions. sFRP1 treatment increased β -catenin staining at cell-cell junctions in the coculture. Arrows indicate cell-cell junctions. Abbreviations: Cont, control; GFP, green fluorescent protein; MSC, mesenchymal stem cell; rb, recombinant bovine; sFRP-1, secreted Frizzled-related protein-1; SMC, smooth muscle cell.

sFRP1 Improved Vessel Organization

These data suggested that sFRP1 is involved in the MSC acquisition of a mature SMA-positive phenotype, an elongated morphology, stress fiber architecture, and an increase of β -catenin-dependent cell-cell junctions, which correlates with *in vivo* observations. We observed a rearrangement of MSC in the vessel wall under sFRP1 conditions. sFRP1-MSC were more elongated and aligned along the vessel wall compared with control MSC (Fig. 7A, 7B). Together, these data indicate that sFRP1 is required for formation of highly organized MSC joined around the neovessel wall.

We then speculated that the enhancement of endogenous sFRP1 signaling in MSC may modify MSC interaction with mural cells, reinforcing neovessel stabilization *in vivo*. GFP/SM-MHC double staining was analyzed by confocal analysis, and the three-dimensional images were reconstructed with Imaris software. We observed that MSC were in close contact with mural cells in sFRP1 group (i.e., less than 1.5 μm distance between MSC and SMC, on average), whereas control MSC were constantly in loose association (Fig. 7A–7C). Thus, a MSC source of sFRP1 appeared to be required for the establishment of a tight association of MSC with mural cells, which is crucial for the mature vessel persistence.

DISCUSSION

In this study, we demonstrated that transplantation of MSC increased the angiogenic response in a Matrigel assay, and we propose that MSC contribute to the angiogenic processes by their participation as perimural effector cells. Genetic MSC modifications by a modulator of the Wnt/Fz pathway, sFRP1, enhanced their association to mural cells and increased neovessel maturation and stabilization.

The Matrigel model is an efficient angiogenic model that has been extensively used to study angiogenic events [1, 40]. In

our study, 5 days after Matrigel injection, MSC were organized in primitive vessel-like structures, containing red blood cells with branches in connection with host-circulation. They induced a rapid recruitment of host CD31+ cells compared with control. After 13 days, more than 40% of CD31-positive blood vessels in the plug were covered with MSC. Earlier studies have shown that MSC transplantation has a beneficial therapeutic role in experimental models of ischemic disease [41, 42]; however, the governing molecular mechanism still remains unclear. Some groups have reported that secretion of a large number of potent mediators would potentially be more relevant to MSC angiogenic properties than transdifferentiation of MSC into EC [43]. All these previous divergent results could be ascribed to distinct sources of MSC [44]. In our transplantation model, MSC were very rarely integrated in the EC layer but were constantly observed as perivascular cells. Forming a coating around the EC sheet, MSC expressed the pericyte and SMC markers NG-2 and SMA, respectively. These results are in agreement with a recent study that demonstrated that human mesenchymal stem cells (hMSC) express SMC markers *in vitro* [26]. These findings prompted us to hypothesize that MSC could behave as pericyte-like cells that initiate and allow the establishment of mature vessels. *In vivo* hMSC coimplanted with EC differentiated into and functioned as perivascular cells, and several studies have shown that pericytes play an early role in the development of neovessels [21, 26, 45, 46]. These observations support recent evidence of immature pericyte tubes without endothelial cells in human fetal brain [47]. Moreover, MSC express high levels of angiogenic factors, such as VEGF, FGF2, TGF β , and MMP2/9, which may be involved to a certain extent in MSC angiogenic-induced responses.

Insights into mechanisms that reinforce the recruitment of MSC around vessels may have important implications for the development of angiogenic cell therapy to stabilize neovessels. Notably, the degree of pericyte coverage influences vessel response to VEGF [48, 49]. We have previously demonstrated the

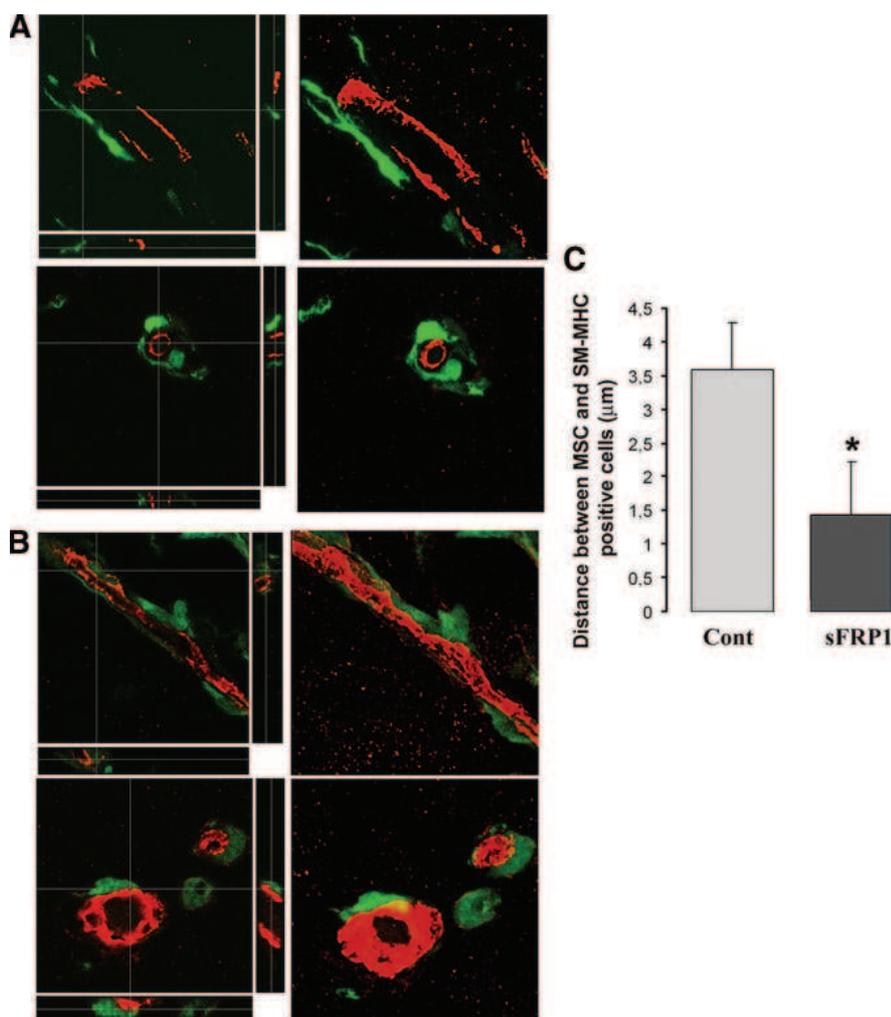


Figure 7. sFRP1 improved vessel organization. Confocal images of neovessels in plug containing either GFP-MSC infected with Cont adenoviral vector expressing β -galactosidase (A) or GFP-MSC infected with adenoviral vector expressing sFRP1 (B). Double immunolabeling for SM-MHC (red) labeled differentiated smooth muscle cells (SMC) and GFP (green) labeled MSC. In (A) and (B), left panels show z-stack confocal images, and right panels show three-dimensional reconstruction images obtained with Imaris software. In (A) and (B), right panels show close-ups of longitudinal and cross-sectional views of neovessels. Under sFRP1 overexpression conditions, MSC encircling neovessels were in closer contact with SMC compared with the Cont condition. (C): Histogram illustrates distance analysis between GFP-positive MSC and SM-MHC-positive SMC in neovessels under sFRP1 overexpression versus Cont condition in neovessels. *, $p < .001$. Abbreviations: Cont, control; MSC, mesenchymal stem cell; sFRP1, secreted Frizzled-related protein-1; SM-MHC, smooth muscle-myosin heavy chain.

importance of sFRP1, a modulator of the Wnt/Fz pathway, in neovessel formation in different angiogenic models [31, 34]. Recent data have demonstrated that Wnt signaling regulates basic stem cell features, such as self-renewal of intestinal epithelial stem cells [50] and hematopoietic stem cells [51]. In another study, Wnt3A-conditioned medium was shown to promote human MSC proliferation and invasion [28]. In addition, we have demonstrated here that murine MSC are equipped with many frizzled receptors and can respond to Wnt canonical activation. In this study, murine MSC engineered to overexpress sFRP1 enhanced angiogenic and arteriogenic MSC capacity. It appeared that sFRP1 had a critical role in favoring MSC association with neovessels. The functional importance of mural cell coverage by the pericytes has been established by the demonstration that pericyte depletion/genetic modification strategies can block neo-vascularization [25, 40, 52–54]. A key feature was the demonstration of their crucial role in neovessel stability and integrity [25]. In accordance with these studies, we showed that enhancement of MSC recruitment into arterioles under sFRP1 activation correlated with an increase in vessel maturation and functionality. Moreover, blockade of GSK3 β activity in MSC abolished sFRP1-induced neovessel formation and maturation, demonstrating that GSK3 β is a key relay for exogenous sFRP1 upstream signal to promote MSC angiogenic properties.

We demonstrate here that forced expression of sFRP1 is instrumental for an efficient MSC integration around vessels and induces mature vessels in Matrigel plug by affecting the organization of MSC around the vascular wall. sFRP1-MSC

were elongated into the vessel wall. These observations were in line with the finding that in vitro, treatment of MSC with sFRP1 modified MSC morphology. Under control conditions, MSC contact neighboring mesenchymal cells only focally, whereas under sFRP1 activation, MSC are closely adjoined by β -catenin cell-cell junction enhancement that maintains the integrity of MSC layer [55]. We further analyzed whether in vitro MSC could engage cell-cell junctions with mural cells. To model the vascular cell-MSC communication induced by sFRP1, coculture experiments were designed and revealed the ability of MSC to communicate with both EC and SMC by β -catenin-dependent cell-cell junctions. These data suggest that sFRP1 promoted vessel stability and organization by increasing homotypic and heterotypic β -catenin cell-cell junctions. Interestingly, recombinant sFRP1 increased the SMA expression of MSC, suggesting that sFRP1 could reinforce MSC differentiation toward a pericyte-like phenotype. Together, these observations could account for a strengthened role of sFRP1 in primitive MSC pericyte-like tube organization.

sFRP1 activation did not modify VEGF, FGF2, or TGF β expression in MSC and did not induce any MSC transdifferentiation in EC or SMC. It is worth noting that sFRP1 induced an enhancement of expression of PDGF-BB that may be functionally important during blood vessel formation. The PDGF-BB pathway is a key pathway involved in blood vessel maturation during embryonic [52] and postnatal [56] development and in tumor vessel formation [25]. It is tempting to speculate that PDGF-BB induction by sFRP1 could partici-

pate in pericyte/SMC recruitment, leading to enhancement of blood vessel stabilization by mural cells.

SUMMARY

Our study reveals a novel structural role of MSC in the angiogenesis process. MSC are able to form primitive vascular networks that precede endothelial cell recruitment and could function as perivascular cells. We demonstrate that genetic modification of MSC with the sFRP1 gene before transplantation could be a potent strategy for regenerative medicine of ischemic tissue. sFRP1 increases MSC homotypic and heterotypic cell-cell junctions in a manner correlated with neovessel maturation and stabilization.

REFERENCES

- 1 Al-Khaldi A, Al-Sabti H, Galipeau J et al. Therapeutic angiogenesis using autologous bone marrow stromal cells: Improved blood flow in a chronic limb ischemia model. *Ann Thorac Surg* 2003;75:204–209.
- 2 Kasper G, Dankert N, Tuischer J et al. Mesenchymal stem cells regulate angiogenesis according to their mechanical environment. *STEM CELLS* 2007;25:903–910.
- 3 Gruber R, Kandler B, Holzmann P et al. Bone marrow stromal cells can provide a local environment that favors migration and formation of tubular structures of endothelial cells. *Tissue Eng* 2005;11:896–903.
- 4 Pereira RF, Halford KW, O'Hara MD et al. Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:4857–4861.
- 5 Galmiche MC, Koteliansky VE, Briere J et al. Stromal cells from human long-term marrow cultures are mesenchymal cells that differentiate following a vascular smooth muscle differentiation pathway. *Blood* 1993;82:66–76.
- 6 Abedin M, Tintut Y, Demer LL. Mesenchymal stem cells and the artery wall. *Circ Res* 2004;95:671–676.
- 7 Kashiwakura Y, Katoh Y, Tamayose K et al. Isolation of bone marrow stromal cell-derived smooth muscle cells by a human SM22alpha promoter: In vitro differentiation of putative smooth muscle progenitor cells of bone marrow. *Circulation* 2003;107:2078–2081.
- 8 Matsumura G, Miyagawa-Tomita S, Shin'oka T et al. First evidence that bone marrow cells contribute to the construction of tissue-engineered vascular autografts in vivo. *Circulation* 2003;108:1729–1734.
- 9 Hoerstrup SP, Kadner A, Melnitchouk S et al. Tissue engineering of functional trileaflet heart valves from human marrow stromal cells. *Circulation* 2002;106:1143–1150.
- 10 Fox JM, Chamberlain G, Ashton BA et al. Recent advances into the understanding of mesenchymal stem cell trafficking. *Br J Haematol* 2007;137:491–502.
- 11 Hungerford JE, Little CD. Developmental biology of the vascular smooth muscle cell: Building a multilayered vessel wall. *J Vasc Res* 1999;36:2–27.
- 12 Mangi AA, Noiseux N, Kong D et al. Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts. *Nat Med* 2003;9:1195–1201.
- 13 Silva GV, Litovsky S, Assad JA et al. Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model. *Circulation* 2005;111:150–156.
- 14 Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS et al. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation* 2004;109:1543–1549.
- 15 Gnechi M, He H, Noiseux N et al. Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. *FASEB J* 2006;20:661–669.
- 16 Tang YL, Zhao Q, Qin X et al. Paracrine action enhances the effects of autologous mesenchymal stem cell transplantation on vascular regeneration in rat model of myocardial infarction. *Ann Thorac Surg* 2005;80:229–236; discussion 236–237.
- 17 Hung SC, Pochampally RR, Chen SC et al. Angiogenic effects of human multipotent stromal cell conditioned medium activate the PI3K-Akt pathway in hypoxic endothelial cells to inhibit apoptosis, increase survival, and stimulate angiogenesis. *STEM CELLS* 2007;25:2363–2370.
- 18 De Palma M, Venneri MA, Galli R et al. Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Grant 503254 from the European Vascular Genomics Network and by Grant 2006005678 from the Fondation de France. L.L. is a recipient of a grant from the Groupe de Réflexion pour la Recherche Cardiovasculaire and a grant from the Fondation pour la Recherche Médicale.

DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

The authors indicate no potential conflicts of interest.

- and a mesenchymal population of pericyte progenitors. *Cancer Cell* 2005;8:211–226.
- 19 Song S, Ewald AJ, Stallcup W et al. PDGFRbeta+ perivascular progenitor cells in tumours regulate pericyte differentiation and vascular survival. *Nat Cell Biol* 2005;7:870–879.
- 20 Rajantie I, Ilmonen M, Alminante A et al. Adult bone marrow-derived cells recruited during angiogenesis comprise precursors for periendothelial vascular mural cells. *Blood* 2004;104:2084–2086.
- 21 Tigges U, Hyer EG, Scharf J et al. FGF2-dependent neovascularization of subcutaneous Matrigel plugs is initiated by bone marrow-derived pericytes and macrophages. *Development* 2008;135:523–532.
- 22 Gerhardt H, Betsholtz C. Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. *Cell Tissue Res* 2003;314:15–23.
- 23 Betsholtz C, Lindblom P, Gerhardt H. Role of pericytes in vascular morphogenesis. *EXS* 2005;115–125.
- 24 Bergers G, Song S. The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro Oncol* 2005;7:452–464.
- 25 Abramsson A, Lindblom P, Betsholtz C. Endothelial and nonendothelial sources of PDGF-B regulate pericyte recruitment and influence vascular pattern formation in tumors. *J Clin Invest* 2003;112:1142–1151.
- 26 Au P, Tam J, Fukumura D et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells facilitate engineering of long-lasting functional vasculature. *Blood* 2008;111:4551–4558.
- 27 Reya T, Duncan AW, Ailles L et al. A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* 2003;423:409–414.
- 28 Neth P, Ries C, Karow M et al. The Wnt signal transduction pathway in stem cells and cancer cells: Influence on cellular invasion. *Stem Cell Rev* 2007;3:18–29.
- 29 Etheridge SL, Spencer GJ, Heath DJ et al. Expression profiling and functional analysis of wnt signaling mechanisms in mesenchymal stem cells. *STEM CELLS* 2004;22:849–860.
- 30 Ezan J, Leroux L, Barandon L et al. FrzA/sFRP1, a secreted antagonist of the Wnt-Frizzled pathway, controls vascular cell proliferation in vitro and in vivo. *Cardiovasc Res* 2004;63:731–738.
- 31 Dufourcq P, Leroux L, Ezan J et al. Regulation of endothelial cell cytoskeletal reorganization by a secreted frizzled-related protein-1 and frizzled 4- and frizzled 7-dependent pathway: Role in neovessel formation. *Am J Pathol* 2008;172:37–49.
- 32 Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res* 2004;95:9–20.
- 33 Derval N, Barandon L, Dufourcq P et al. Epicardial deposition of endothelial progenitor and mesenchymal stem cells in a coated muscle patch after myocardial infarction in a murine model. *Eur J Cardiothorac Surg* 2008;34:248–254.
- 34 Dufourcq P, Couffinhal T, Ezan J et al. FrzA, a secreted frizzled related protein, induced angiogenic response. *Circulation* 2002;106:3097–3103.
- 35 Summers SA, Kao AW, Kohn AD et al. The role of glycogen synthase kinase 3beta in insulin-stimulated glucose metabolism. *J Biol Chem* 1999;274:17934–17940.
- 36 Chartier C, Degryse E, Gantzer M et al. Efficient generation of recombinant adenovirus vectors by homologous recombination in *Escherichia coli*. *J Virol* 1996;70:4805–4810.
- 37 Passaniti A, Taylor RM, Pili R et al. A simple, quantitative method for assessing angiogenesis and antiangiogenic agents using reconstituted basement membrane, heparin, and fibroblast growth factor. *Lab Invest* 1992;67:519–528.
- 38 Kim HS, Skurk C, Thomas SR et al. Regulation of angiogenesis by glycogen synthase kinase-3beta. *J Biol Chem* 2002;277:41888–41896.
- 39 Hellström M, Kalen M, Lindahl P et al. Role of PDGF-B and PDGFR-

- beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development* 1999;126:3047–3055.
- 40 Kano MR, Morishita Y, Iwata C et al. VEGF-A and FGF-2 synergistically promote neoangiogenesis through enhancement of endogenous PDGF-B-PDGFRbeta signaling. *J Cell Sci* 2005;118:3759–3768.
- 41 Shake JG, Gruber PJ, Baumgartner WA et al. Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: Engraftment and functional effects. *Ann Thorac Surg* 2002;73:1919–1925, discussion 1926.
- 42 Nagaya N, Kangawa K, Itoh T et al. Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy. *Circulation* 2005;112:1128–1135.
- 43 Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS et al. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ Res* 2004;94:678–685.
- 44 Karnoub AE, Dash AB, Vo AP et al. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* 2007;449:557–563.
- 45 Ozerdem U, Stallcup WB. Early contribution of pericytes to angiogenic sprouting and tube formation. *Angiogenesis* 2003;6:241–249.
- 46 Betsholtz C. Insight into the physiological functions of PDGF through genetic studies in mice. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004;15:215–228.
- 47 Virgintino D, Girolamo F, Errede M et al. An intimate interplay between precocious, migrating pericytes and endothelial cells governs human fetal brain angiogenesis. *Angiogenesis* 2007;10:35–45.
- 48 Benjamin LE, Golijanin D, Itin A et al. Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *J Clin Invest* 1999;103:159–165.
- 49 Gee MS, Procopio WN, Makonnen S et al. Tumor vessel development and maturation impose limits on the effectiveness of anti-vascular therapy. *Am J Pathol* 2003;162:183–193.
- 50 Korinek V, Barker N, Moerer P et al. Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nat Genet* 1998;19:379–383.
- 51 Willert K, Brown JD, Danenberg E et al. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* 2003;423:448–452.
- 52 Lindahl P, Johansson BR, Levéen P et al. Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science* 1997;277:242–245.
- 53 Darland DC, Massingham LJ, Smith SR et al. Pericyte production of cell-associated VEGF is differentiation-dependent and is associated with endothelial survival. *Dev Biol* 2003;264:275–288.
- 54 Bergers G, Song S, Meyer-Morse N et al. Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors. *J Clin Invest* 2003;111:1287–1295.
- 55 Dejana E. Endothelial cell-cell junctions: Happy together. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004;5:261–270.
- 56 Lindblom P, Gerhardt H, Liebner S et al. Endothelial PDGF-B retention is required for proper investment of pericytes in the microvessel wall. *Genes Dev* 2003;17:1835–1840.



See www.StemCells.com for supplemental material available online.

**Secreted Frizzled-Related Protein-1 Enhances Mesenchymal Stem Cell Function
in Angiogenesis and Contributes to Neovessel Maturation**

Pascale Dufourcq, Betty Descamps, Nancy Ferreira Tojais, Lionel Leroux, Pierre
Oses, Danièle Daret, Catherine Moreau, Jean-Marie Daniel Lamazière, Thierry
Couffinhal and Cécile Duplâa

Stem Cells 2008;26:2991-3001; originally published online Aug 28, 2008;
DOI: 10.1634/stemcells.2008-0372

This information is current as of July 28, 2009

**Updated Information
& Services**

including high-resolution figures, can be found at:
<http://www.StemCells.com/cgi/content/full/26/11/2991>

Supplementary Material

Supplementary material can be found at:
<http://www.StemCells.com/cgi/content/full/2008-0372/DC1>

 **AlphaMed Press**

II. Effet du préconditionnement des MSC en hypoxie 1% d'O₂ sur la régénération vasculaire

Dans les organismes eucaryotes, la concentration en O₂ varie selon le type cellulaire. Par exemple, dans l'organisme humain, les parenchymes pulmonaires présente un taux d'O₂ compris entre 14 % et 4 % ; dans le cerveau, ce taux varie entre 1 % et 5 % (Ivanovic 2009). Dans la moelle osseuse, les cellules souches vivent dans des niches de cellules souches dont la concentration en O₂ varie entre 0 % et 4 % (Chow et al. 2001; Tondevoid et al. 1979). Ainsi, lorsque les cellules de la moelle osseuse sont cultivées à de telles concentrations, elles se retrouvent dans leur environnement habituel, appelé hypoxie physiologique.

Ce taux d'O₂ a un impact sur les propriétés des cellules souches. Dans le même milieu de culture et en présence des mêmes facteurs solubles, la réponse proliférative des cellules souches hématopoïétiques est complètement différente (Ivanovic 2009; Koller et al. 1992; Koller et al. 1992). De plus la privation en O₂ régule la transcription des gènes dans les cellules souches, et régule leur différenciation (Desplat et al. 2002; Kovacevic-Filipovic et al. 2007; Potier et al. 2007). Le taux d'O₂ ressenti par les cellules hématopoïétiques induit notamment l'expression du facteur de transcription induit par l'hypoxie (HIF, ou Hypoxia-inducible transcription factor), qui induit à son tour le relargage de cytokines angiogéniques nécessaires à leur survie, telles que le VEGF et l'angiopoïétine-1 (Ramirez-Bergeron et al. 2006). Les facteurs HIFs induisent aussi la transition des progéniteurs vasculaires présents dans la moelle osseuse adulte en cellules plus différenciées, positives pour les marqueurs CD31, VEGFR2, la NO synthase endothéliale (eNOS), et d'autres marqueurs endothéliaux matures (Du et al. 2008; Tillmanns et al. 2008).

Ce facteur HIF a donc un effet majeur sur le devenir des cellules souches. Une étude a montré que la transplantation de progéniteurs endothéliaux (EPC) surexprimant HIF-1 α améliore la revascularisation de la patte ischémisée par induction de la différenciation, la prolifération et de la migration des EPC par l'hypoxie (Jiang et al. 2008).

Le potentiel angiogénique des MSC a été étudié dans des modèles murins où l'environnement du tissu évolue d'une hypoxie sévère vers une progressive réoxygénation. Ce changement environnemental constituerait un signal qui, au niveau des niches riches en cellules souches, induirait l'activation et la mobilisation des cellules résidentes, participant à la formation des néo-vaisseaux. Des études ont montré le rôle de gradients hypoxiques sur le trafic des MSC dans les tissus ischémiques (Ceradini et al. 2004). La voie Wnt/ β -caténine dépendante est une

voie conservée impliquée dans l'auto-renouvellement des cellules souches. Nous avons donc émis l'hypothèse que le pré-conditionnement hypoxique (1% d'O₂) des MSC pourrait être un facteur favorisant leur potentiel angiogénique via l'activation d'une voie Wnt/ β -caténine dépendante. C'est pourquoi l'étude de l'article II porte sur la comparaison du potentiel des MSC prétraitées en 1% d'O₂ avec des MSC maintenues en 20% d'O₂ sur la réparation vasculaire et tissulaire, dans un modèle d'ischémie du membre inférieur, et sur la recherche des mécanismes moléculaires mis en jeu. Cette étude est en cours de soumission.

Article II

Mesenchymal stem cells preconditioned by hypoxia improve vascular and skeletal myoblast regeneration after ischemia through a Wnt4 dependent pathway

Comme nous l'avons vu précédemment, les MSC participent à l'angiogenèse, et peuvent se différencier notamment en péricytes (Dufourcq et al. 2008), en CE vasculaires (Muguruma et al. 2006; Oswald et al. 2004) ou en cardiomyocytes (Toma et al. 2002). D'ailleurs, dans des modèles d'ischémie de patte chez le Rat ou de cardiomyopathie dilatée chez le Porc, leur transplantation peut améliorer l'ischémie (Al-Khaldi et al. 2003; Nagaya et al. 2005; Shake et al. 2002). Cependant, l'efficacité de stratégie de transplantation des MSC est limitée par l'incapacité de maintenir un grand nombre de cellules, après la greffe, dans les sites hypoxiques.

Dans cet article, nous avons montré que le préconditionnement des MSC en hypoxie a permis d'améliorer la régénération vasculaire et tissulaire du membre inférieur de la souris après ischémie de la patte. En effet, l'injection de MSC dans le muscle ischémié induit une augmentation rapide du nombre de vaisseaux (micro-CT et immunofluorescence) et une récupération du flux sanguin (analyse doppler). Ces effets sur la perfusion et sur la réparation tissulaire sont majorés lorsque les MSC sont maintenues en culture en 1% d'O₂ avant d'être injectées. Cette réponse se traduit aussi par une activation du processus de réparation puisque la taille de la nécrose est fortement diminuée dans ces conditions.

Associé à cet effet angiogénique, les muscles greffés avec des MSC hypoxiques présentent, lors de leur réparation, une importante augmentation du taux de VEGF. Cette sécrétion de VEGF sera sûrement requise pour la formation des néo-vaisseaux.

Le préconditionnement des MSC en hypoxie a également permis d'améliorer le maintien du nombre de cellules après implantation dans le muscle de la patte ischémique, en améliorant la survie et la prolifération de ces cellules *in situ*. Dans ce modèle, les MSC hypoxiques

n'engagent pas leur différenciation et n'adoptent pas de phénotype endothélial. Elles gardent leur propriété de péricytes en se comportant comme des cellules vasculaires et couvrent les CE afin de rendre les vaisseaux plus matures, plus robustes et plus stables (Dufourcq et al. 2008). Cependant, nous avons observé que les MSC hypoxiques étaient fortement localisées dans des zones profondément ischémiques, au niveau des myoblastes en nécrose, suggérant que les MSC acquéraient des propriétés macrophagiques. *In vitro*, nous avons montré que les MSC avaient la capacité de phagocyter des membranes de myoblastes. *In vivo*, elles arborent un phénotype plus allongé avec de longues protrusions de filopodes, encerclant ainsi les myocytes morts. Dans ces zones très ischémiques, les MSC pourraient donc aider au nettoyage des débris cellulaires de muscle squelettique.

In vitro, les MSC conditionnées en hypoxie sont plus efficaces que les MSC cultivées en condition normale (ou normoxie) dans l'induction de la migration des CE, et dans la différenciation et la survie des MSC. Cet effet semble être lié à l'activation spécifique du ligand Wnt4, dont son expression augmente fortement dans des MSC cultivées en hypoxie. D'ailleurs, *in vivo*, l'injection de MSC hypoxiques augmente de façon importante l'expression de Wnt4 dans les tissus en réparation. Wnt4 affecte aussi la prolifération et la migration des MSC, mais seulement en condition hypoxique via une signalisation Wnt/ β -caténine dépendante. Enfin, il induit aussi la différenciation des myoblastes *in vitro*. Ainsi, l'induction de Wnt4 *in vivo* après injection des MSC hypoxiques pourrait participer à la régénération vasculaire et tissulaire, via un mécanisme paracrine et autocrine.

Mesenchymal stem cells preconditioned by hypoxia improve vascular and skeletal myoblast regeneration after ischemia through a Wnt4 dependent pathway

Running title: role of hypoxia on MSC regenerative properties

Lionel Leroux, Betty Descamps, Nancy Ferreira Tojais, Benjamin Séguy, Pierre Oses, Catherine Moreau, Danièle Daret, Zoran Ivanovic, Jean-Michel Boiron, Jean-Marie Daniel Lamazière, Pascale Dufourcq, Thierry Couffinhal, Cécile Duplâa

Inserm U828, Pessac, France; Université « Victor Ségalen » Bordeaux 2, Bordeaux, France. (B.D.; N.F.; B.S.; C.M.; JM. DL.; P.D., T.C.; C.D.)

Department of Cardiology, Pôle Cardiothoracique, Hôpital Haut Lévêque, Pessac 33604, France. (L.L.; P.O.; T.C.)

Etablissement Français du Sang (EFS), Bordeaux. (Z.I.; JM. B.)

Laboratoire de biochimie, UFR Sciences Pharmaceutiques; Université « Victor Ségalen » Bordeaux 2, Bordeaux, France (P.D.)

Correspondence to Cécile Duplâa, Inserm U828, Av du Haut Lévêque, PESSAC 33604, France. Tel 33 557891975- E-mail cecile.duplâa@inserm.fr

Word count : 6 100

Subject codes : [17] Peripheral vascular disease ; [97] Other Vascular biology ; [129] Angiogenesis ; [130] Animal models of human disease ; [151] Ischemic biology - basic studies ;

Abstract

Rationale: Mesenchymal stem cells (MSC) are multipotent postnatal stem cells, involved in the treatment of ischemic vascular diseases. However, their potential is currently limited by several factors; poor viability after transplantation, and low differentiation capacity in host tissue.

Objective: The present study was designed to investigate the ability of MSC, exposed to short term hypoxic conditions, to participate in vascular and tissue regeneration in an *in vivo* model of hindlimb ischemia.

Methods and Results: MSC were exposed to 1% O₂ pre-conditioning for 36 hours (HypMSC) or maintained at 20% O₂ (NormMSC), prior to transplantation into mice with ischemic hind limbs. Transplantation of 0.5x10⁶ HypMSC regenerated nearly 90% of skeletal muscle at day 7, improved blood flow and vascular formation compared to injected NormMSC. These observed effects were correlated with an increase in HypMSC engraftment and a putative role in necrotic skeletal myoblast clearance. Moreover, HypMSC transplantation resulted in a large increase in Wnt4 expression and we demonstrate its functional significance on MSC proliferation and migration, endothelial cell migration, as well as myoblast differentiation. Furthermore, suppression of Wnt4 expression in HypMSC, abrogated the hypoxia-induced vascular regenerative properties of these cells in the mouse hind limb ischemia model.

Conclusion: Our data suggest that hypoxic preconditioning plays a critical role in the functional capabilities of MSC, shifting MSC location *in situ* to enhance ischemic tissue recovery, facilitating vascular cell mobilization and skeletal myoblast regeneration via a paracrine Wnt dependent mechanism.

Keywords: Angiogenesis; Ischemia; vascular biology; stem cells

Non-standard Abbreviations and Acronyms:

MSC	Mesenchymal stem cells
HypMSC	Hypoxia preconditioned MSC
NormMSC	MSC cultured in normoxia
MNC	Mononuclear cells
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
O ₂	Oxygen
sFRP-1	secreted Frizzled related protein -1
LPDI	Laser Doppler Perfusion Image
mCT	micro scanner
GFP	Green Fluorescent Protein
BrdU	BromodeoxyUridine
EC	Endothelial cells
NG2	Neuron-Glial antigen 2
TGF-β	Transforming Growth Factor beta
Ang	Angiopoietine
bFGF	basic Fibroblast Growth factor
PDGFB	Platelet Derived Growth factor B
HypCM	HypMSC Conditioned Medium
Wnt4 CM	Wnt4 Conditioned Medium
NormCM	NormMSC Conditioned Medium
Rb sFRP-1	Recombinant bovine secreted Frizzled related protein -1
Dkk1	Dickkopf
TCF	T-Cell Factor

Introduction

Bone marrow mesenchymal stem cells (MSC) can be isolated from bone marrow-derived mononuclear cells (MNC), expanded *in vitro* and have been shown to possess functional multi lineage differentiation capacity¹. Asahara, et al, demonstrated that MSC can be mobilized into peripheral blood and recruited to sites of tissue damage². Such reports have lead to the hypothesis that MSC may be used in the treatment of ischemic cardiovascular pathologies. Indeed, MSC have been shown to differentiate into pericytes³, vascular endothelial cells^{4, 5} and cardiomyocytes⁶, and their transplantation has improved recovery from ischemia in rat hindlimb and swine dilated cardiomyopathy models⁷. Their precocious role in the formation and the maintenance of neo vessels has been studied extensively^{3, 8}. One major limitation demonstrated in both animal and human experiments has been the inability to maintain a large number of cells after grafting into hypoxic sites. In the current study we employed a strategy of low oxygen (O₂)- preconditioning of MSC before tissue implantation. We hypothesized that creating this hypoxic environment might mimic the stem cell niche microenvironment *in vivo* which others have hypothesized to likely create a hypoxic cavity⁹. We chose to study 1% O₂ concentration since it has been reported as the level found *in vivo* in bone marrow stem cell niche areas¹⁰. Moreover, data from animal studies have demonstrated a role of hypoxic gradients in stem cell trafficking in ischemic tissue¹¹. On the molecular level, temporary oxygen deprivation is known to regulate gene transcription and differentiation of stem cells^{12, 13}. Several reports suggest that the Wnt pathway plays a role in maintaining hematopoietic stem cell self-renewal and pluripotency^{14, 15}. The Wnt family of genes encodes over twenty cysteine-rich secreted glycoproteins to regulate canonical and non canonical signaling pathways¹⁶. The canonical Wnt pathway regulates gene expression due to the stabilization and nuclear localization of β catenin. We have previously demonstrated that MSC have a structural role in forming a precocious network and facilitating neovessel recruitment in an angiogenic model and reported that overexpression of a soluble modulator of Wnt functions, sFRP-1, in MSC, enhanced their angiogenic capacities³. Experimental manipulation of a pluripotent mouse embryonal carcinoma stem cell line via another secreted Wnt modulator, sFRP2, identified the Wnt pathway in cardiomyogenic differentiation¹⁷. Wnt3a activation modulated proliferation and differentiation of human MSC and murine embryonic mesenchymal cells^{18, 19}. Recently, another study demonstrated a role of the Wnt signaling pathway in the acquisition of the invasion property of human MSC²⁰. These data have been particularly important to help elucidate the molecular mechanism that enables MSC to contribute to tissue regeneration under ischemic conditions.

In the current study, we compare the ability, of hypoxic preconditioned murine MSC (HypMSC) and non-preconditioned MSC (NormMSC), to engraft into ischemic tissue and assessed the ability of these cells to participate in skeletal tissue and vascular regeneration. A sub acute murine limb ischemia model was used to mimic the clinical setting of critical limb ischemia in patients. Our results demonstrate that HypMSC have a greater capacity for engraftment in ischemic tissue compared to NormMSC. HypMSC also improved skeletal muscle regeneration and induced more neoangiogenesis, and elicited significant improvement in blood flow as compared to NormMSC. Localization of HypMSC compared to NormMSC suggests that HypMSC participate in the remodeling of the stromal environment via structural interactions, first in encircling necrotic myocytes and then shaping a tight network around endothelial cells along growing neovessels. This preferential localization led us to speculate that MSC could functionally interact via paracrine effectors with myocytes and EC. Our data demonstrates that MSC express Wnt4 and *in vivo*Wnt4 transcripts were significantly increased in ischemic muscles engrafted with HypMSC while in muscle engrafted with NormMSC no significant increase was detected. We tested the biological activity of Wnt4 *in vitro* and found that it could stimulate EC migration, myogenic differentiation and MSC proliferation but had no effect on EC proliferation. Importantly, inhibition of Wnt4 expression in MSC abrogated HypMSC-induced vascular regeneration. Our data provides strong evidence that Wnt signaling could be an important factor in the mechanism by which MSC contribute to tissue regeneration, as well as vessel formation and stabilization. As such, hypoxia preconditioning of MSC could be an attractive therapeutic approach for the treatment of ischemic vascular diseases.

Methods

MSC^{3, 21} were treated for 36 hours at 1% O₂ in a hypoxia chamber (HypMSC) (C21 Proox chamber, BioSpherix, New York) or maintained at 20% O₂ (NormMSC) before being injected into a mouse ischemic hind limb. Mice were randomly assigned to three treatment groups. One group underwent sham treatment (i.e., aperture and saline injection) (control group). The other groups received injection of either 0.5 x10⁶ NormMSC or HypMSC. Detailed description of materials, animal procedures, MSC preparation, hindlimb ischemia model, tissue collection and preparation for biochemical assays, Laser Doppler Perfusion Imaging (LPDI), microCT analysis, immunohistochemistry, macrophagic assays, and *in vitro* cell functional assays can be found in the Online Data Supplement.

Results

Vascular and muscle regeneration of the ischemic hindlimb was improved after transplantation of HypMSC vs NormMSC

We examined the comparative effectiveness of transplanted murine HypMSC vs NormMSC for vascular and ischemic muscle regeneration after femoral ligation in C57BL/6J mice. Three groups were set up: a control sham group receiving saline injection, a NormMSC group receiving 0.5x10⁶ MSC cultured in normoxia (20% O₂) and a HypMSC group transplanted with 0.5x10⁶ MSC pretreated during 36 hours in a reduced oxygen tension (1% O₂).

HypMSC enhanced vascular response

Blood flow recovery in the limb of HypMSC-treated animals was significantly improved when compared with sham-treated animals or NormMSC-treated animals (Fig. 1A, B).

The therapeutic action of HypMSC was also evident at the angiogenic level, as evidenced by quantification of only viable muscle, excluding angiogenesis involved in an inflammatory response to granulation tissue. At day 15, there was a 1.75 fold increase in CD31-positive capillary number (P<10⁻⁵) and a 1.9 fold increase in the number of arterioles (P<10⁻³) in HypMSC-treated muscles compared with that in sham-treated control muscles. The number of capillaries and arterioles were significantly increased in HypMSC-treated animals over NormMSC group and control group at day 7 and day 15 (Fig 1C-J). These results suggest a potent role of HypMSC in new-vessel formation and stabilization. Consistent with improved limb perfusion and capillary density, micro scanner (mCT) analysis of the whole arterial network revealed the global impact of HypMSC on vessel formation in the hindlimb after ischemia. Images showed a greater number of vessels in HypMSC-treated hind limb compared to NormMSC or sham-treated injected hindlimb at day 8 after the insult (Fig.1K-M). We calculated a 2 fold increase in the vessel number (number of vessels/μm³, P<0.01) and a 1.7 fold increase in their connectivity and branching (P<0.01) in the HypMSC-treated hindlimb compared with sham-treated control animals while NormMSC-treated animals were at an intermediate level (P<0.05) (Fig. 1N-O).

HypMSC enhanced muscle regeneration

Histological evaluation of muscle tissue, performed to analyze the impact of HypMSC transplantation on the repair process, revealed that administration of either HypMSC or NormMSC accelerated the repair process. At day 7, almost no overt necrotic area was found in either of the MSC-treated groups, while necrotic muscle fibers were markedly observed in sham treated muscles (25% out of total muscle surface). However, HypMSC engraftment had a significant beneficial effect on muscle regeneration when compared with NormMSC-treated group. Less than 10% of the histological area in the ischemic muscle were still actively regenerating in HypMSC-treated tissue while in the NormMSC treated group, the process was delayed with over 21% of the total muscle surface was still actively regenerating (Fig. 1P-U).

Hypoxic pretreatment modified MSC engraftment in ischemic hindlimb

MSC were infected with a lentivirus encoding for the GFP gene (GFP-MSC) and expression was followed as a marker of viable GFP-positive MSC³. HypMSC robustly engrafted the adductor and tibial muscles in large patches, as revealed by direct fluorescence at day 7 (suppl Fig. 1A) or anti-GFP immunohistochemistry at day 14 (suppl Fig. 1B).

Hypoxic treatment improved MSC survival capacities in vivo

Real time RT-PCR was performed using total RNA obtained from HypMSC and NormMSC injected muscles at day 7 after injury to determine the percentage of remaining GFP expression, and demonstrated that hypoxic pre-treatment contributes to effective enhancement of MSC recruitment *in vivo*. In the HypMSC group, there was a significant increase in MSC engraftment at day 7 (150% of initially engrafted HypMSC) where as in NormMSC group, the total number of MSC was not maintained after transplantation (63% of initially engrafted NormMSC) (Fig. 2A). At day 7, double BrdU/GFP labeling revealed that BrdU incorporation rate was significantly increased in HypMSC group compared to NormMSC group (16.3 ± 8.1 vs 13.1 ± 6.6 BrdU/GFP + cells/mm² $P < 0.05$) (Fig. 2B). BrdU/GFP positive MSC were detected in tissue sections in highly reparative zones surrounding necrotic myocytes (Fig. 2B).

HypMSC were widespread in hypoxic zones and may play a macrophage-like function

HypMSC appeared to have a different pattern of engraftment as compared to NormMSC. To better understand this, we evaluated the scattering of MSC in hypoxic zones using the 2-nitroimidazole hypoxia marker, pimonidazole. Hypoxic sections of muscle produced a mottled staining with a characteristic hypoxic brown center. At day 7, a large number of GFP-positive HypMSC were evenly distributed in deep hypoxic zones around necrotic myocytes whereas GFP-positive NormMSC were consistently detected at the periphery of ischemic zones in highly reparative muscle sections (Fig. 3A and suppl Fig. 2). The distribution of MSC around necrotic myocytes suggested a potential macrophage-like, phagocytic function for these cells. GFP immunofluorescent staining revealed that MSC harbor a phenotype with long filopodial protrusions that can encircle and penetrate into dead myocytes (Fig. 3B, A-C). To evaluate the phagocytic capacity of MSC in regards to myocytes, *in vitro* experiments were conducted. Fluorescent microscopy examination revealed that GFP-MSC co-cultured with necrotic cell bodies of PKH-labeled murine myoblasts (red) were able of robustly engulf part of the myoblast cell membranes (Fig. 3B, E). GFP-MSC co-cultured with non-necrotic PKH-labeled murine skeletal myoblasts (red) did not have this property (Fig. 3B, D). At day 15, HypMSC appeared to be preferentially associated with capillaries and microvessels, behaving as perivascular cells shaping along the whole length of the vessel, covering growing CD31- forming tube-like structures, as mural cells (Suppl Fig. 3; see on line suppl data).

HypMSC paracrine Wnt dependent effect on angiogenesis and muscle regeneration

The effects of temporary hypoxia on Wnt factor expression were also investigated. Several studies have demonstrated a role of the Wnt pathway in vascular development²³ as well as stem cell proliferation and maintenance¹⁴. We hypothesized that MSC express Wnt and use the Wnt pathway as a mechanism for activation of muscle regeneration processes. Screening by RT-PCR for the expression of different *Wnt* transcripts revealed that MSC express *Wnt4*, *5A*, *5B* and *11*. *In vivo*, *Wnt4* transcripts were significantly increased in HypMSC injected muscles (ratio *Wnt4/P0*: 15.6 ± 5.2 , $P = 0.01$ vs control tissues) while NormMSC implantation did not significantly increase *Wnt4* transcripts (ratio *Wnt4/P0*: 3.8 ± 1.8 , $P = \text{NS}$ vs control tissues) (Fig. 4). *Wnt5A*, *5B* and *11* expression were not significantly modified in either HypMSC and NormMSC injected muscles compared with control muscle at day 7 after ischemia. Corroborating evidence was found *in vitro* where a specific strong up-regulation of *Wnt4* was detected after exposing MSC to hypoxia for 36 hours compared to normoxia-treated MSC (*Wnt4/P0*: 4.78 ± 1.8 , $P = 0.01$ in comparison to control) (Suppl Fig. 3C). In

parallel, we report preconditioning effects on angiogenic growth factor expressions by HypMSC (see on line suppl data).

Functional validation of HypMSC secreted factors on cell functions

To further elucidate the functional paracrine and autocrine role of HypMSC secreted factors in vascular response and muscle regeneration enhancement, we studied the effect of *ex vivo* incubation of the different cellular components namely EC, myoblasts and MSC with HypMSC and Wnt4 conditioned medium (HypCM and Wnt4 CM, respectively).

HypMSC secreted factors and Wnt4 played a role on EC migration but not on EC proliferation

Transwell filters revealed that HypCM and Wnt4 CM induced significantly more migration of EC than did respectively CM from NormMSC (NormCM) and control CM ($P < 0.05$). Moreover, addition of a secreted Wnt antagonist, rb sFRP-1, blocked the HypCM-induced migration suggesting that Wnt dependent factors are the major active factors present in HypCM. (Fig. 5A and suppl Fig.5). It is worth noting that rb sFRP-1 enhanced migration of both NormCM-treated EC and control EC, which is in agreement with previous reports²⁴. Interestingly, HypCM had no effect on EAhy926 proliferation compared with CM from NormMSC (NorCM) (data non shown). Taken together, these results support a role of HypCM and Wnt4 on EC migration.

Wnt4 induced skeletal myoblast differentiation

To explore the potential role of Wnt4 on skeletal muscle differentiation, intact primary murine skeletal myoblasts were cultured in the presence of Wnt4 CM for 16 hours and compared with myoblasts treated with control CM. The results revealed that the number of myogenin-expressing cells was significantly increased in Wnt4-treated myoblast culture compared to control condition ($P < 0.01$) (Fig. 5B).

Autocrine role of Wnt4 promoted MSC proliferation, migration and Wnt canonical \square catenin pathway activation

We then tested the hypothesis that enhancement of HypMSC engraftment could be due in part to *Wnt4* upregulation. The role of Wnt4 as a potent inducer of MSC migration was demonstrated (Fig. 5C). In addition, data revealed an effect of Wnt4 on the number of MSC but only under hypoxic conditions (Fig. 5D). Moreover, Wnt4 was able to activate the canonical Wnt pathway as shown by T-Cell factor (TCF) -dependent transcriptional activity measured under hypoxic conditions; transfection of MSC with a plasmid coding for Wnt4 provoked a 15-fold increase in luciferase activity (Fig. 5E). No activation was seen by using the corresponding control reporter with mutated TCF binding sites. Inhibition of Wnt signaling using rb sFRP1 also effectively suppressed TopFlash luciferase reporter activities in response to Wnt4. Our data are consistent with the interpretation that Wnt4 signals are transduced via the canonical branch of the Wnt pathway and reveal that MSC respond to Wnt4 stimuli in a hypoxic environment.

Suppression of Wnt4 expression in HypMSC prevented the vascular regenerative response induced by hypoxia pre treatment

An *in vivo* model of *Wnt4* suppression was employed to demonstrate the importance of Wnt4 as a key paracrine factor mediating pro-angiogenic effects of HypMSCs. As such, we treated HypMSC with two siRNA against *Wnt4*²⁶ and transplanted them into the mouse ischemic hindlimb model. We showed that siControl (siCtl) treated HypMSC compared to siCtl treated NormMSC enhanced significantly the blood flow ($P < 0.05$) (Fig. 6A), and vascular density ($P < 0.05$) and connectivity ($P > 0.05$) (Fig. 6B-D). Treatment of HypMSC with siRNA against *Wnt4* abrogated the difference between HypMSC and NormMSC groups; either blood flow or vascular density and connectivity were not significantly different between siWnt4 treated HypMSC and siCtl treated NormMSC groups.

Discussion

The influence of temporary hypoxic preconditioning of MSC on the stimulation of angiogenesis and muscle regeneration was investigated and the data revealed that *ex vivo* hypoxic preconditioning of MSC plays a unique role in the enhancement of vessel formation and repair of the necrotic zone after a hindlimb ischemia via a Wnt dependent pathway.

We hypothesized that the 1% oxygen atmosphere in which MSC were maintained could condition them to survive in a hypoxic environment *in vivo*. Oxygen tension in bone marrow compartments has been reported to be very low as in injured tissue, suggesting that tissue hypoxia may be a fundamental mechanism governing stem cell recruitment and retention¹¹. As a result, we demonstrated that hypoxic pretreatment can more effectively overcome the hurdle of cell death after implantation than normoxic conditioning, promoting MSC survival and proliferation *in situ*. HypMSC engrafted robustly in ischemic tissue and their proliferation index in ischemic sites was superior to that of NormMSC. The decline MSC number that has been previously described could be due to cytokine secretion and tissue remodeling²⁷ or immune rejection by the host as they expressed GFP a well-known immunogen²⁸.

MSC have been successively administered as a treatment in both animal studies^{7, 21, 27} and human clinical trials^{29, 30}. Studies showed their possible contribution to vascular structures and skeletal muscle *in vivo*. For example, injection of MSC in a rat model of dilated cardiomyopathy revealed that some of the MSC were differentiated into cardiomyocytes⁷. The application of MSC improves wound healing regeneration through differentiation²⁷. Recent studies suggest that monocytes under activation could express EC markers and form tube-like structures³¹. The setting of hypoxic preconditioning in this study, did not enhance cell differentiation into EC, as HypMSC kept their pericyte-like properties and behaved as perivascular cells as reported^{3, 32}. One of the most striking and consistent findings in this study was that HypMSC engrafted into hypoxic zones at early time points, which lends support to they hypothesis that these cells have an important role in tissue regeneration. Their tissue localization led us to hypothesize a potential macrophage-like role in which they participate in phagocytosis of necrotic myoblasts.. Our data indicates that MSC have the ability to participate in the phagocytic process of myoblasts *in vitro* and to encircle and send extensions into necrotic myoblasts *in vivo*, which could indicate that these cells participate in clearing skeletal muscle cellular debris. This process has similarities with previously published data which demonstrated that macrophages reorganize their actin cytoskeleton to form phagocytic lamellipodia structures to engulf apoptotic cells³³. Moreover, at early timepoints MSC appear to play a role in neovessel formation encircling endothelial cells in capillaries and microvessels and participating in their stabilization as previously described^{34, 35}. Our results support the notion that MSC play a cooperative role in both myocyte regeneration and vascular formation by structural and functional interaction with both myocytes and EC.

As MSC have been shown to secrete a large quantity of angiogenic factors³⁶, we investigated the potential involvement of paracrine and/or endocrine factors produced by MSC. Previous reports have demonstrated that conditioned medium from MSC can promote EC migration, differentiation and survival³⁷. Our data indicate that conditioned medium from HypMSC is more effective than conditioned medium from NormMSC in inducing EC migration as well as MSC proliferation and migration. As the Wnt signaling pathway has been shown to play a role in stem cell fate¹⁴, muscle regeneration³⁸, vascular formation³⁹ and invasion capacity of MSC²⁰, we hypothesized that this pathway may be involved in the mechanism involved in this process. Our study identified that Wnt4 was specifically over expressed *in vitro* in conditioned media from HypMSC and that, *in vivo*, injection of HypMSC into the ischemic hindlimb strongly induced Wnt4 expression. We also demonstrate that Wnt4 exerts an effect on myoblast differentiation, *in vitro*. We have established a role of Wnt4 as a potent mediator in vascular regeneration as it affects EC migration. It is worth noting that Wnt4 conditioned medium could affect MSC migration and proliferation but only under hypoxic conditions through a canonical \square catenin dependent Wnt signaling. Thus, it is likely that, *in situ*, residual tissue hypoxia confers responsiveness of MSC to environmental signals. Moreover, Wnt4 signaling was shown to stimulate myogenic proliferation and differentiation during chick development

⁴⁰ and satellite cell proliferation in skeletal muscle in myostatin-knockout mice ⁴¹. Finally we demonstrate here that, knockdown of Wnt4 expression resulted in inhibition of the beneficial impact of HypMSC on vascular regeneration compared with that induced by NormMSC. Collectively, these results strongly support the hypothesis that Wnt4 secreted by MSC is an important factor in mediating tissue regeneration in the setting of ischemia.

In conclusion, we have demonstrated that hypoxic preconditioning of MSC prior to transplantation could be a potent strategy in overcoming the current limitations in the field of regenerative medicine. This study suggests that many of the cellular functions associated with the ability of MSC to regenerate ischemic tissue are often not expressed constitutively by MSC but rather only transiently. MSC respond to contextual signals according to their microenvironment.

SOURCE OF FUNDING

This work was supported by a grant from the Fondation of France (grant #2006005678), Communauté de Travail Pyrénéenne and from the Fondation pour la Recherche Médicale. L.L. was a recipient of a grant from the Groupe de Réflexion pour la Recherche Cardiovasculaire.

DISCLOSURE

None

REFERENCES

1. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284:143-147.
2. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997;275:964-967.
3. Dufourcq P, Descamps B, Tojais NF, Leroux L, Oses P, Daret D, Moreau C, Lamaziere JM, Couffinhal T, Duplaa C. Secreted frizzled-related protein-1 enhances mesenchymal stem cell function in angiogenesis and contributes to neovessel maturation. *Stem Cells*. 2008;26:2991-3001.
4. Muguruma Y, Yahata T, Miyatake H, Sato T, Uno T, Itoh J, Kato S, Ito M, Hotta T, Ando K. Reconstitution of the functional human hematopoietic microenvironment derived from human mesenchymal stem cells in the murine bone marrow compartment. *Blood*. 2006;107:1878-1887.
5. Oswald J, Boxberger S, Jorgensen B, Feldmann S, Ehninger G, Bornhauser M, Werner C. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells*. 2004;22:377-384.
6. Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation*. 2002;105:93-98.
7. Nagaya N, Kangawa K, Itoh T, Iwase T, Murakami S, Miyahara Y, Fujii T, Uematsu M, Ohgushi H, Yamagishi M, Tokudome T, Mori H, Miyatake K, Kitamura S. Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 2005;112:1128-1135.
8. Abramsson A, Lindblom P, Betsholtz C. Endothelial and nonendothelial sources of PDGF-B regulate pericyte recruitment and influence vascular pattern formation in tumors. *J Clin Invest*. 2003;112:1142-1151.
9. Moore KA, Lemischka IR. Stem cells and their niches. *Science*. 2006;311:1880-1885.

10. Chow DC, Wenning LA, Miller WM, Papoutsakis ET. Modeling pO₂ distributions in the bone marrow hematopoietic compartment. II. Modified Kroghian models. *Biophys J*. 2001;81:685-696.
11. Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, Tepper OM, Bastidas N, Kleinman ME, Capla JM, Galiano RD, Levine JP, Gurtner GC. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med*. 2004;10:858-864.
12. Potier E, Ferreira E, Andriamanalijaona R, Pujol JP, Oudina K, Logeart-Avramoglou D, Petite H. Hypoxia affects mesenchymal stromal cell osteogenic differentiation and angiogenic factor expression. *Bone*. 2007;40:1078-1087.
13. Kovacevic-Filipovic M, Petakov M, Hermitte F, Debeissat C, Krstic A, Jovic G, Bugarski D, Lafarge X, Milenkovic P, Praloran V, Ivanovic Z. Interleukin-6 (IL-6) and low O₂ concentration (1%) synergize to improve the maintenance of hematopoietic stem cells (pre-CFC). *J Cell Physiol*. 2007;212:68-75.
14. Reya T, Duncan AW, Ailles L, Domen J, Scherer DC, Willert K, Hintz L, Nusse R, Weissman IL. A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*. 2003;423:409-414.
15. Malhotra S, Kincade PW. Wnt-related molecules and signaling pathway equilibrium in hematopoiesis. *Cell Stem Cell*. 2009;4:27-36.
16. Bhanot P, Brink M, Samos CH, Hsieh JC, Wang Y, Macke JP, Andrew D, Nathans J, Nusse R. A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature*. 1996;382:225-230.
17. Deb A, Davis BH, Guo J, Ni A, Huang J, Zhang Z, Mu H, Dzau VJ. SFRP2 regulates cardiomyogenic differentiation by inhibiting a positive transcriptional autofeedback loop of Wnt3a. *Stem Cells*. 2008;26:35-44.
18. De Boer J, Wang HJ, Van Blitterswijk C. Effects of Wnt signaling on proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng*. 2004;10:393-401.
19. Derfoul A, Carlberg AL, Tuan RS, Hall DJ. Differential regulation of osteogenic marker gene expression by Wnt-3a in embryonic mesenchymal multipotential progenitor cells. *Differentiation*. 2004;72:209-223.
20. Neth P, Ries C, Karow M, Egea V, Ilmer M, Jochum M. The Wnt signal transduction pathway in stem cells and cancer cells: influence on cellular invasion. *Stem Cell Rev*. 2007;3:18-29.
21. Derval N, Barandon L, Dufourcq P, Leroux L, Lamaziere JM, Daret D, Couffinhal T, Duplaa C. Epicardial deposition of endothelial progenitor and mesenchymal stem cells in a coated muscle patch after myocardial infarction in a murine model. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2008;34:248-254.
22. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006;6:392-401.
23. Zerlin M, Julius MA, Kitajewski J. Wnt/Frizzled signaling in angiogenesis. *Angiogenesis*. 2008;11:63-69.
24. Dufourcq P, Couffinhal T, Ezan J, Barandon L, Moreau M, Daret D, Duplaa C. FrzA, a secreted Frizzled Related Protein, induced angiogenic response. *Circulation*. 2002;106:3097-3103.
25. Chang J, Sonoyama W, Wang Z, Jin Q, Zhang C, Krebsbach PH, Giannobile W, Shi S, Wang CY. Noncanonical Wnt-4 signaling enhances bone regeneration of mesenchymal stem cells in craniofacial defects through activation of p38 MAPK. *J Biol Chem*. 2007;282:30938-30948.

26. Nishizuka M, Koyanagi A, Osada S, Imagawa M. Wnt4 and Wnt5a promote adipocyte differentiation. *FEBS Lett.* 2008;582:3201-3205.
27. Wu Y, Chen L, Scott PG, Tredget EE. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem Cells.* 2007;25:2648-2659.
28. Andersson G, Denaro M, Johnson K, Morgan P, Sullivan A, Houser S, Patience C, White-Scharf ME, Down JD. Engraftment of retroviral EGFP-transduced bone marrow in mice prevents rejection of EGFP-transgenic skin grafts. *Mol Ther.* 2003;8:385-391.
29. Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Gordon PL, Neel M, Sussman M, Orchard P, Marx JC, Pyeritz RE, Brenner MK. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med.* 1999;5:309-313.
30. Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, Ringes-Lichtenberg S, Lippolt P, Breidenbach C, Fichtner S, Korte T, Hornig B, Messinger D, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Drexler H. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet.* 2004;364:141-148.
31. Chen H, Campbell RA, Chang Y, Li M, Wang CS, Li J, Sanchez E, Share M, Steinberg J, Berenson A, Shalitin D, Zeng Z, Gui D, Perez-Pinera P, Berenson RJ, Said J, Bonavida B, Deuel TF, Berenson JR. Pleiotrophin produced by multiple myeloma induces transdifferentiation of monocytes into vascular endothelial cells: a novel mechanism of tumor-induced vasculogenesis. *Blood.* 2009;113:1992-2002.
32. Au P, Tam J, Fukumura D, Jain RK. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells facilitate engineering of long-lasting functional vasculature. *Blood.* 2008;111:4551-4558.
33. Nakaya M, Kitano M, Matsuda M, Nagata S. Spatiotemporal activation of Rac1 for engulfment of apoptotic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105:9198-9203.
34. Tigges U, Hyer EG, Scharf J, Stallcup WB. FGF2-dependent neovascularization of subcutaneous Matrigel plugs is initiated by bone marrow-derived pericytes and macrophages. *Development.* 2008;135:523-532.
35. Dufourcq P, Leroux L, Ezan J, Descamps B, Lamaziere JM, Costet P, Basoni C, Moreau C, Deutsch U, Couffignal T, Duplaa C. Regulation of endothelial cell cytoskeletal reorganization by a secreted frizzled-related protein-1 and frizzled 4- and frizzled 7-dependent pathway: role in neovessel formation. *Am J Pathol.* 2008;172:37-49.
36. Kasper G, Dankert N, Tuischer J, Hoefl M, Gaber T, Glaeser JD, Zander D, Tschirschmann M, Thompson M, Matziolis G, Duda GN. Mesenchymal stem cells regulate angiogenesis according to their mechanical environment. *Stem Cells.* 2007;25:903-910.
37. Hung SC, Pochampally RR, Chen SC, Hsu SC, Prockop DJ. Angiogenic effects of human multipotent stromal cell conditioned medium activate the PI3K-Akt pathway in hypoxic endothelial cells to inhibit apoptosis, increase survival, and stimulate angiogenesis. *Stem Cells.* 2007;25:2363-2370.
38. Poleskaya A, Seale P, Rudnicki MA. Wnt signaling induces the myogenic specification of resident CD45+ adult stem cells during muscle regeneration. *Cell.* 2003;113:841-852.

39. Ezan J, Leroux L, Barandon L, Dufourcq P, Jaspard B, Moreau C, Allieres C, Daret D, Couffignal T, Duplaa C. FrzA/sFRP-1, a secreted antagonist of the Wnt-Frizzled pathway, controls vascular cell proliferation in vitro and in vivo. *Cardiovasc Res.* 2004;63:731-738.
40. Takata H, Terada K, Oka H, Sunada Y, Moriguchi T, Nohno T. Involvement of Wnt4 signaling during myogenic proliferation and differentiation of skeletal muscle. *Dev Dyn.* 2007;236:2800-2807.
41. Steelman CA, Recknor JC, Nettleton D, Reecy JM. Transcriptional profiling of myostatin-knockout mice implicates Wnt signaling in postnatal skeletal muscle growth and hypertrophy. *Faseb J.* 2006;20:580-582.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: augmented vascular regeneration by intramuscular transplantation of MSC in a hindlimb ischemia model.

(A) Images of representative LPDI in sham mice (control W/O cell) and in HypMSC or NormMSC transplanted groups at day 7 and day 15 after ischemia. (B) Quantitative analysis of hindlimb blood perfusion in the HypMSC and NormMSC group one week after transplantation. LPDI index in the HypMSC group was the highest among the three groups at day 7 and day 15. Data are mean \pm S.E.M.; n=15-21 in each group; *, P <0.05 and **, P <0.01 vs control; \$ P<0.05 vs. NormMSC.

Vessel numbers were calculated after CD31 immunolabelling (C-F) and vessel maturation was evaluated by α SMA immunolabeling (G-J) in the control, NormMSC and HypMSC groups. *, P<0.00001 vs. control; \$, P<0.001 vs NormMSC.

Reconstructed micro-CT images of control, NormMSC or HypMSC injected hindlimb 7 days after ischemia in age- and gender-matched mice (K-M) (\square m resolution; n=5). Note marked increase in vessel number (N) and in connectivity (O) in HypMSC treated mice versus NormMSC treated mice and control mice. Data are % \pm S.E.M.; *, P <0.05 and **, P<0.001 vs. control; \$, P<0.05 vs. NormMSC. n=6 in each group.

Repaired surface measurement of control and MSC group (n=6 in each group) in hindlimb ischemic mice. Representative repaired surface and necrotic area were delineated in each group (P-R) and quantified as ratio of necrotic or in repair or repaired surface out of total muscle area (S-U).

Figure 2: Engraftment, survival and proliferation of MSC in ischemic hindlimb tissues: (A)

Engraftment of GFP-MSC in muscle. determined by performing real time RT-PCR. The percentage of engrafted MSC was assessed by the ratio of GFP level at day 7 with that of GFP level at D0 (initial MSC graft) (n=4 in NormMSC and HypMSC groups). The histogram showed a higher persistence of MSC in the muscle at day 7 after injury in HypMSC-treated groups compared to NormMSC-treated group. *, P< 0.05, n=10 (B) Induction of MSC proliferation. Representative photomicrographs of double GFP (green) /BrdU (red) immunofluorescent labelled ischemic hind limb sections at day 7 after ischemia. White arrowheads revealed a higher level of proliferating GFP-MSC in HypMSC injected tissues compared to that in NormMSC injected tissues. The levels of double GFP/BrdU NormMSC and HypMSC were quantified and reported in histogram graphs. *, P<0.05, n=10.

Figure 3: HypMSC engraftment sites could assist MSC in their macrophagic-like role

(A) At day 4, hindlimb muscles transplanted with either NormMSC or HypMSC have large hypoxic zones as revealed using pimonidazole binding (Hypoxyprobe). Immuno staining of GFP-MSC with an antibody directed against GFP (AC anti GFP) showed localization of NormMSC at the peripheral front of hypoxia although HypMSC displayed a scattered distribution inside hypoxia zone.

(B) MSC macrophagic activity. (A-C) immunofluorescent analysis for GFP expression with CD31 (red) on hindlimb tissue section at day 4, revealed that during muscle regeneration, GFP-positive MSC (green) surrounded necrotic myoblast, harboring a spindle shape with long filopodial extensions. Arrow head point to MSC extensions which enter through necrotic skeletal myoblasts. Stars indicate necrotic myoblast. *In vitro*, GFP-positive MSC were mixed with intact PKH-labeled skeletal myoblasts (D) or in contact with PKH-labeled skeletal myoblast particulate debris (E). In presence of myoblast membrane debris, MSC have the capacity to phagocyte particles. The cartoons at right and bottom end side represent perpendicular views of the confocal acquired images(D, E). White lines show myocyte red particulate debris in GFP-MSC cytoplasm (E) .

Figure 4: effects of HypMSC transplantation on Wnt gene expressions. Wnt4, 5A, 5B and 11 expressions in hindlimb ischemic muscle were analyzed by performing real-time PCR. Hindlimb muscles transplanted with NormMSC (Grey bars) or HypMSC (Black bars) or without cells (sham group, white bars) were extracted at day 7 after ischemia. Values are means \pm SD; n=3; the assays were carried out in triplicate. *<0.05, P, \$, P<0.01 vs control.

Figure 5: effect of HypCM and Wnt4 CM on cell properties

(A) Endothelial cell chemotactic migration was quantified using transwell filters. Fluorescent-labelled EAHy926 migrated in the presence in the lower chamber of either NormCM, HypCM and Wnt4CM with or without rb sFRP-1 in the lower chamber. Migrated EC were then lysed and quantified on a fluorimeter. All the CM induced EAHy926 migration. *, P<0.05, \$, P<0.01 vs Control. rbsFRP-1 induced migration in NormCM assays and blocked HypCM and Wnt4CM induced EAHy926 migration (*, P<0.05). (B) Myoblasts were cultured either in control CM (Cont CM) or in Wnt4 CM during 48 hours. Increase expression of myogenin assessed an effect of Wnt4 on myoblast differentiation. The numbers of myogenin-positive nuclei were reported on the graph. \$, P<0.01. (C) The effect of Wnt4 on MSC migration was quantified after in an *in vitro* wound assay. Confluent MSC were wounded and placed during 16 hours in presence of either control CM (cont CM) or Wnt4 CM. Analysis of Wnt4 effect on wound closure was measured as area of migration (μm^2) on phase contrast microscopy images. \$, P<0.01. (D) MSC proliferation of MSC was influenced by Wnt4 overexpression (pWnt4 vs pCDNA3, \$, P<0.01) in hypoxia but not in normoxia. MSC were maintained during 24 hours either in normoxia or in hypoxia after transfection before counting. Values correspond to total cell numbers per well. (E) Wnt4 activates the TopFlash reporter in MSC. Cotransfection of MSC with TopFlash or FopFlash reporter and Wnt4 resulted in more than a 15 fold increase in TopFlash over FopFlash activity compared with MSC transfected with an empty vector (pcDNA3) in hypoxia condition (\$, P<0.01). Adding of rb sFRP-1 blocked either Wnt4 overexpression induced TopFlash over FopFlash activity (*, P<0.05). The experiments were conducted in hypoxia. The error bars indicate on standard deviation from the mean of triplicate samples.

Figure 6: effect of Wnt4 knock down on vascular effect induced by HypMSC: quantitative analysis of hindlimb blood perfusion by calculating the ischemic/normal limb perfusion ratios after the induction of ischemia (A), pictures of representative micro-CT images (B), and microCT quantification of vessel number (C) and connectivity (D) at D7 after injury in mice transplanted either with NormMSC treated with siControl (siCtl-NormMSC), with HypMSC treated with siControl (siCtl-HypMSC) and with HypMSC treated with siWnt4 (siWnt4-HypMSC). N=9 in each group. *, P<0.05.

Fig.1

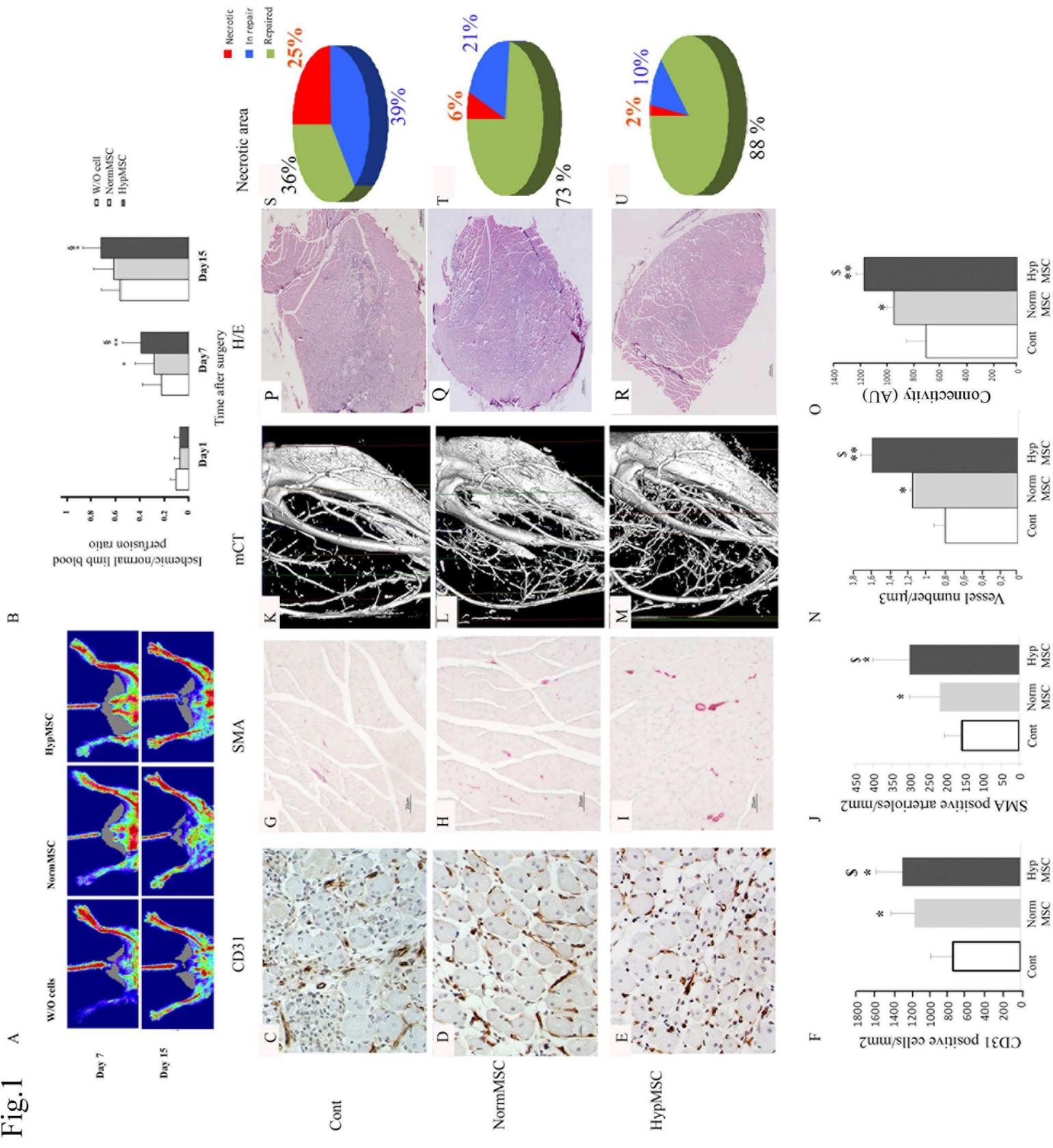
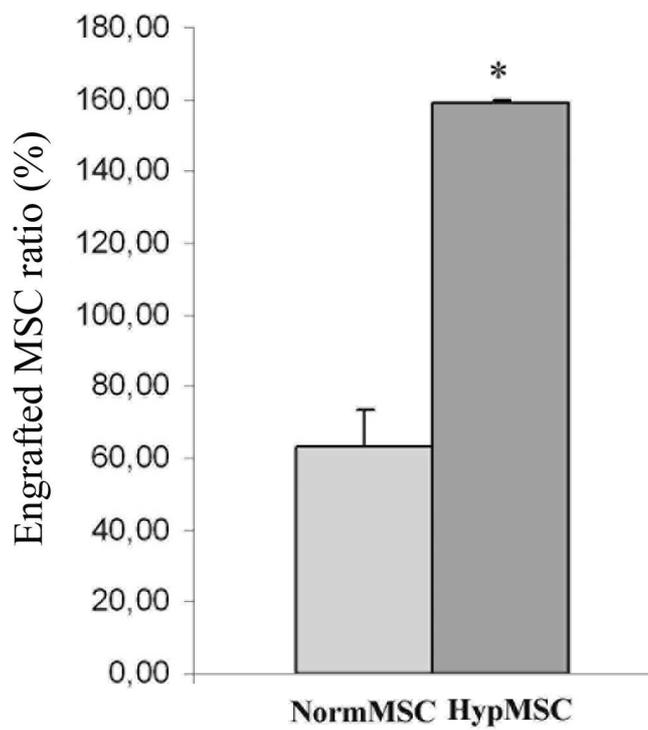
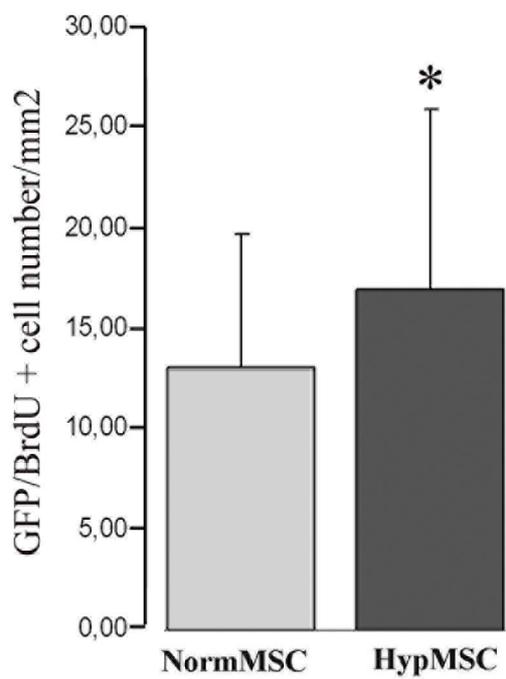


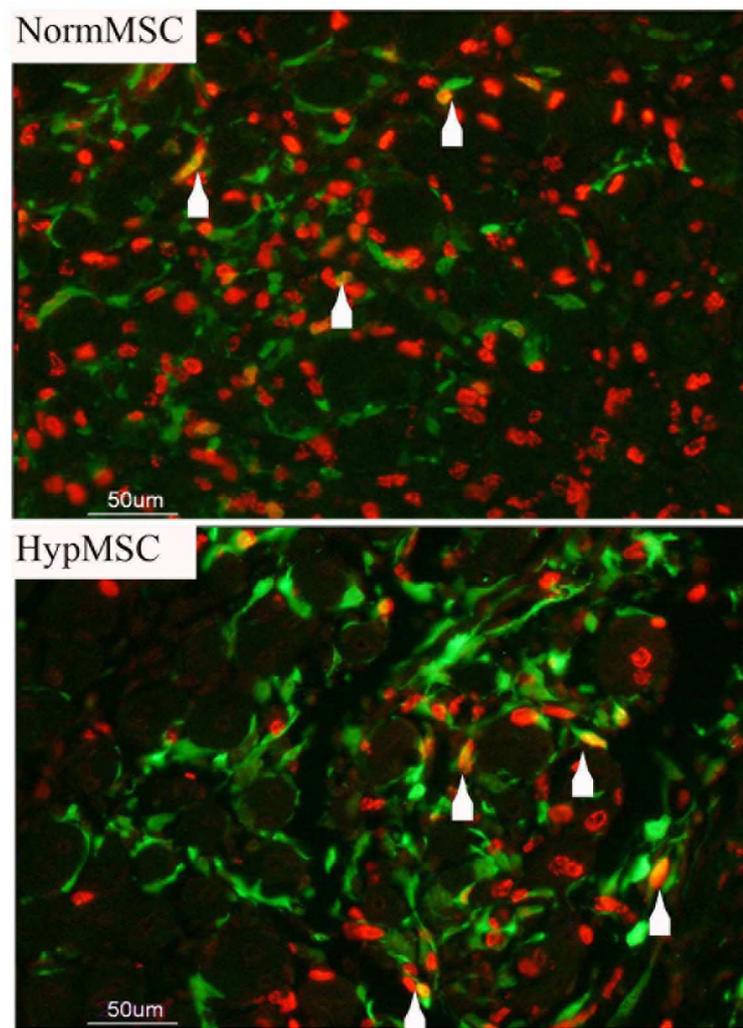
Fig 2 A



B



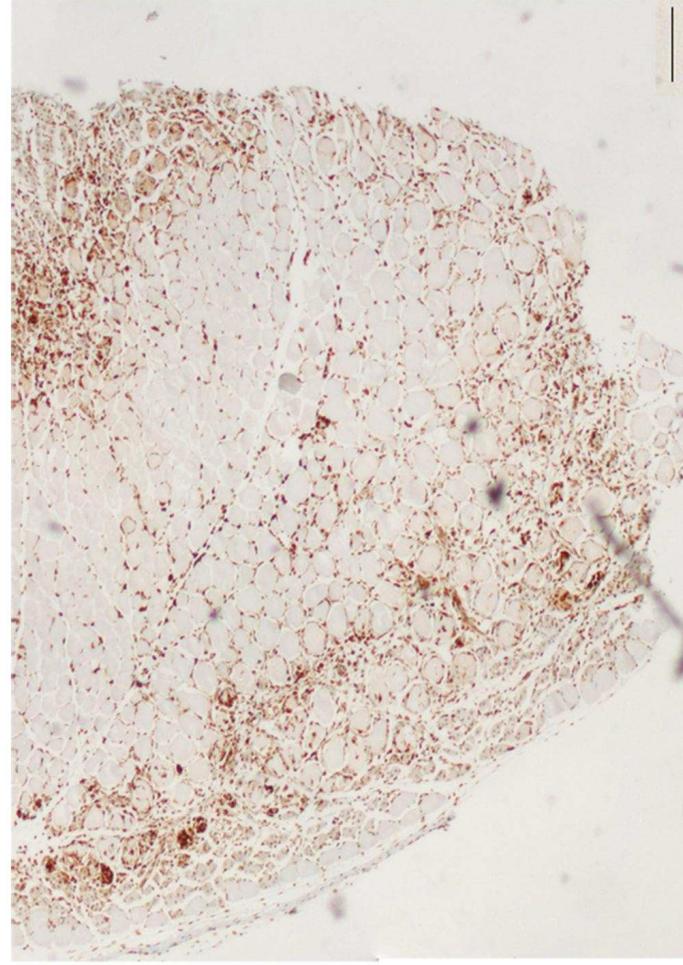
*, p<0.05



MSC/BrdU

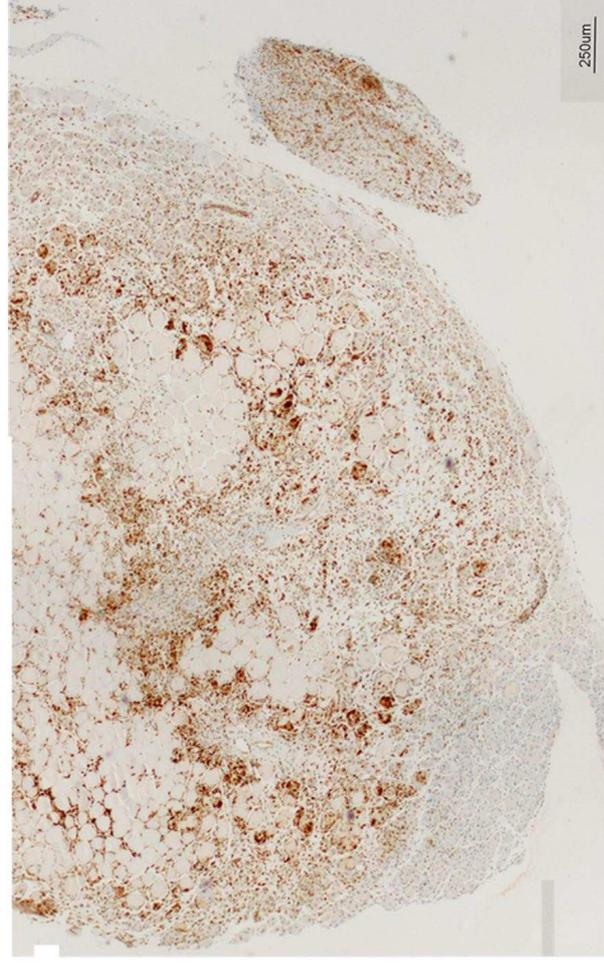
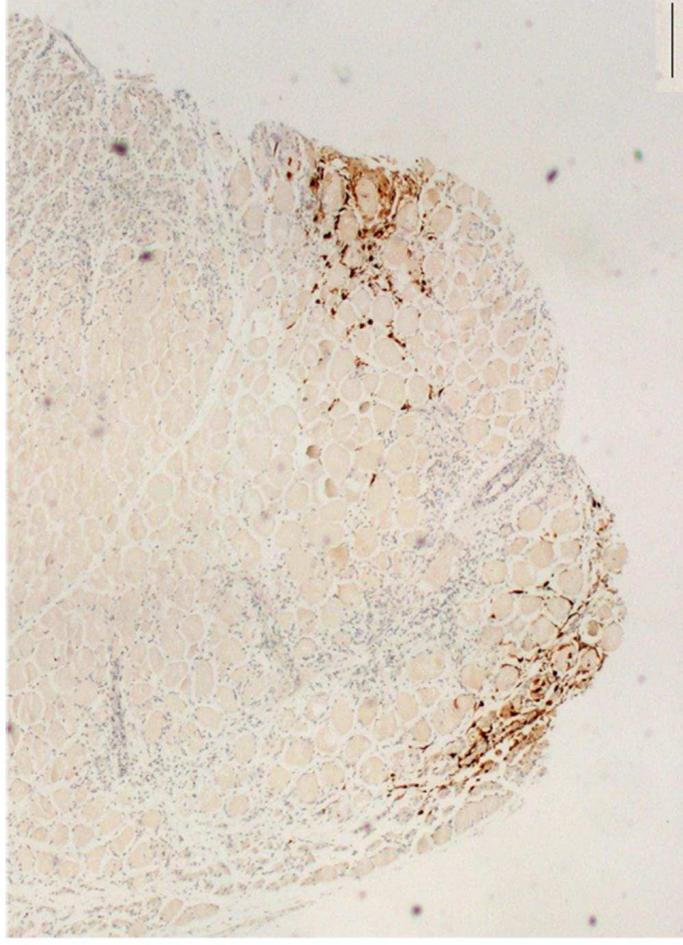
Fig 3A

Hypoxyprobe



NormMSC

AC GFP



HypMSC

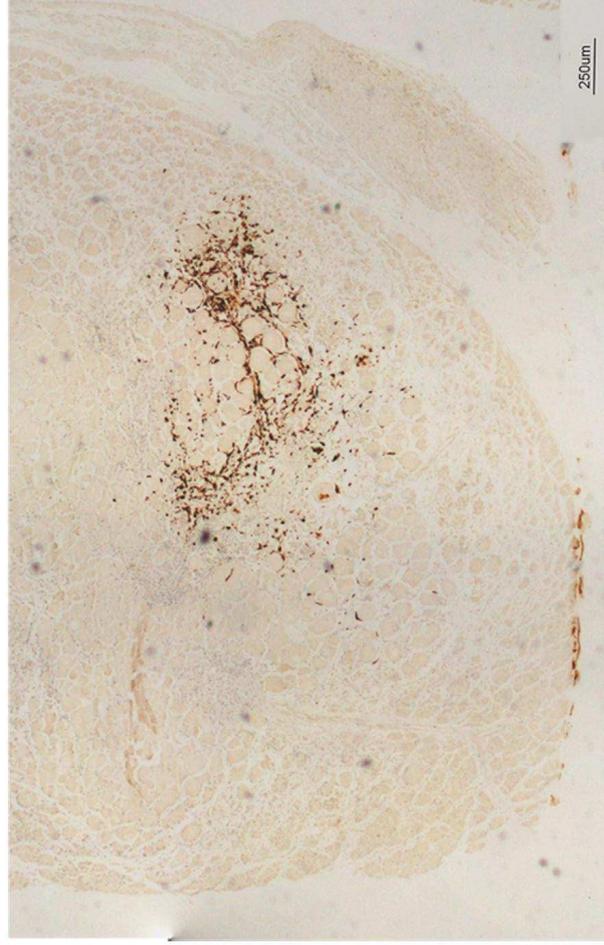
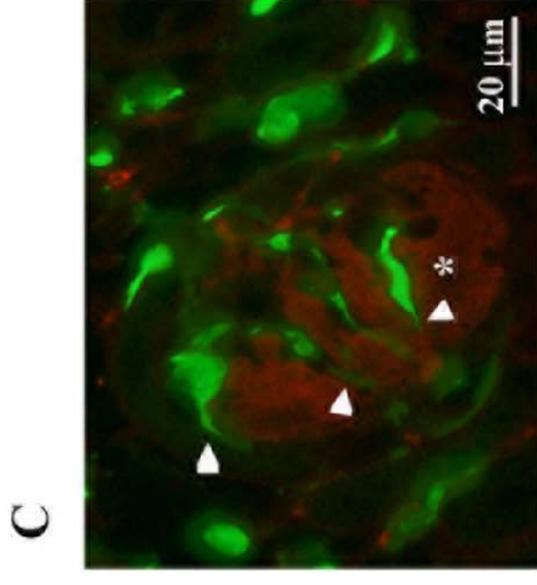
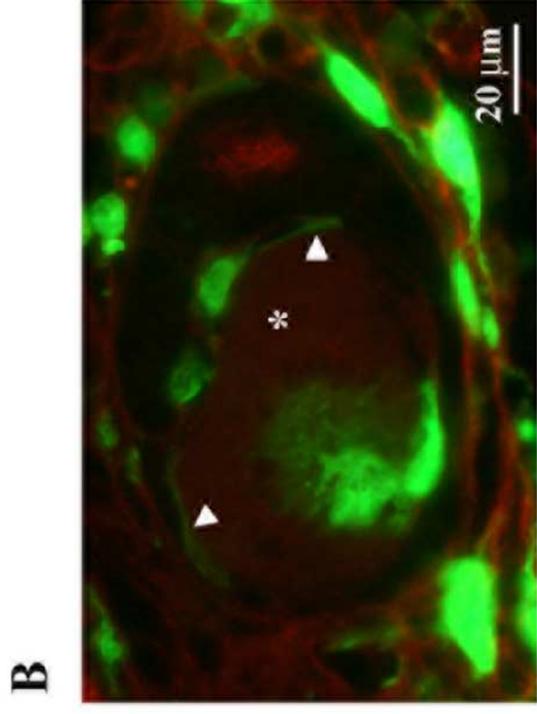
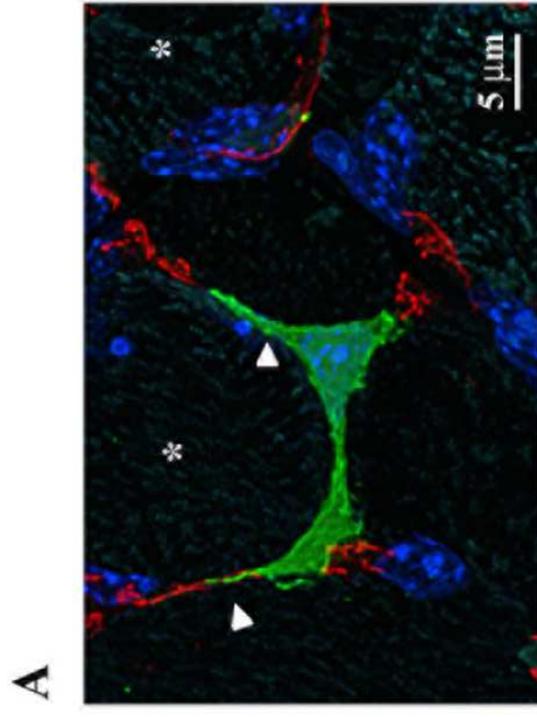


Fig 3B



CD31/GFP

D **GFP-MSK**

+ intact myoblast

E

GFP-MSK

+ particulate myoblast debris

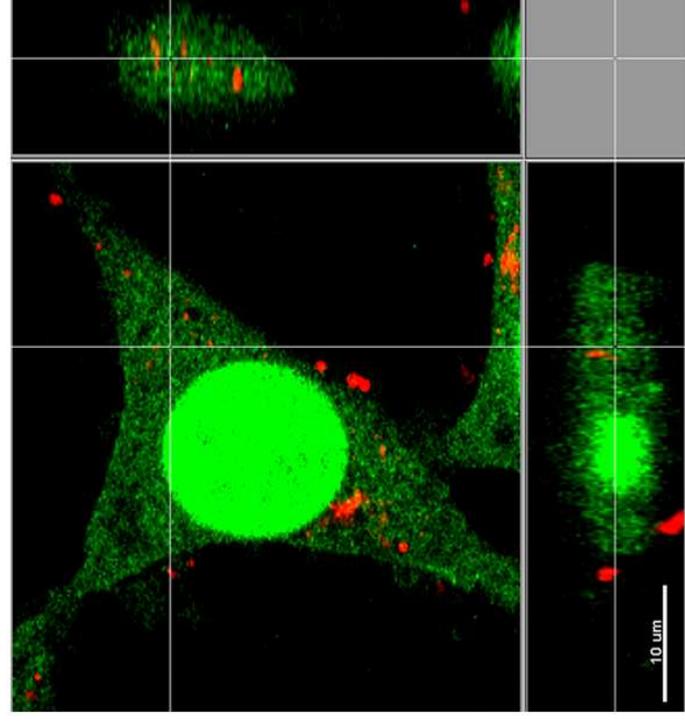
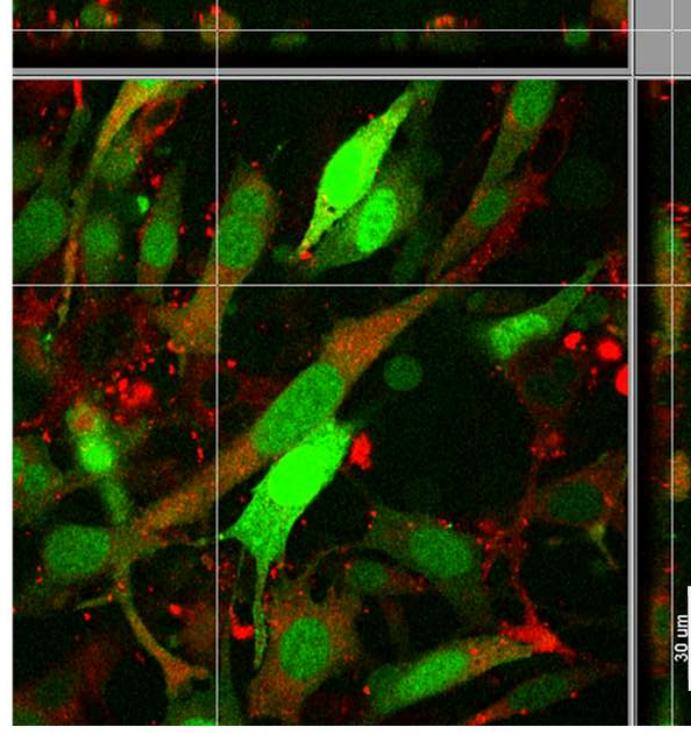
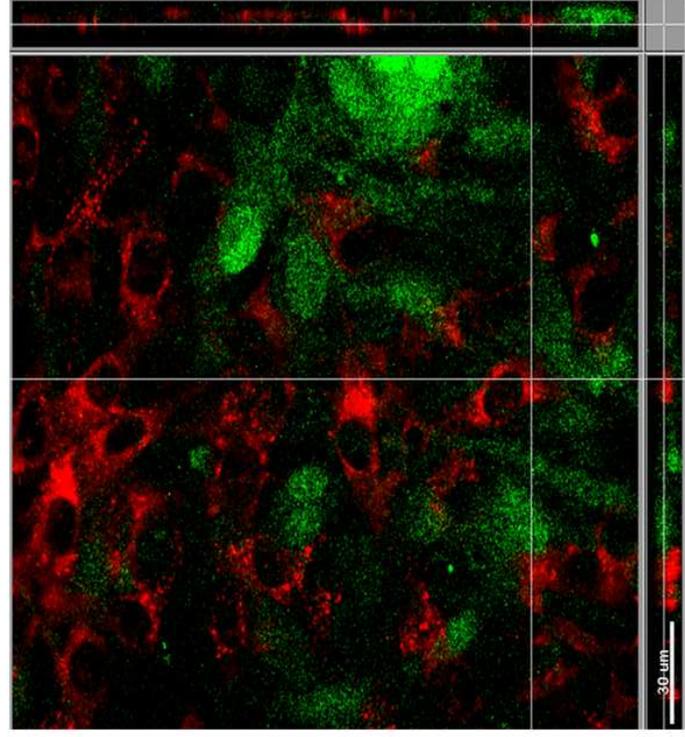
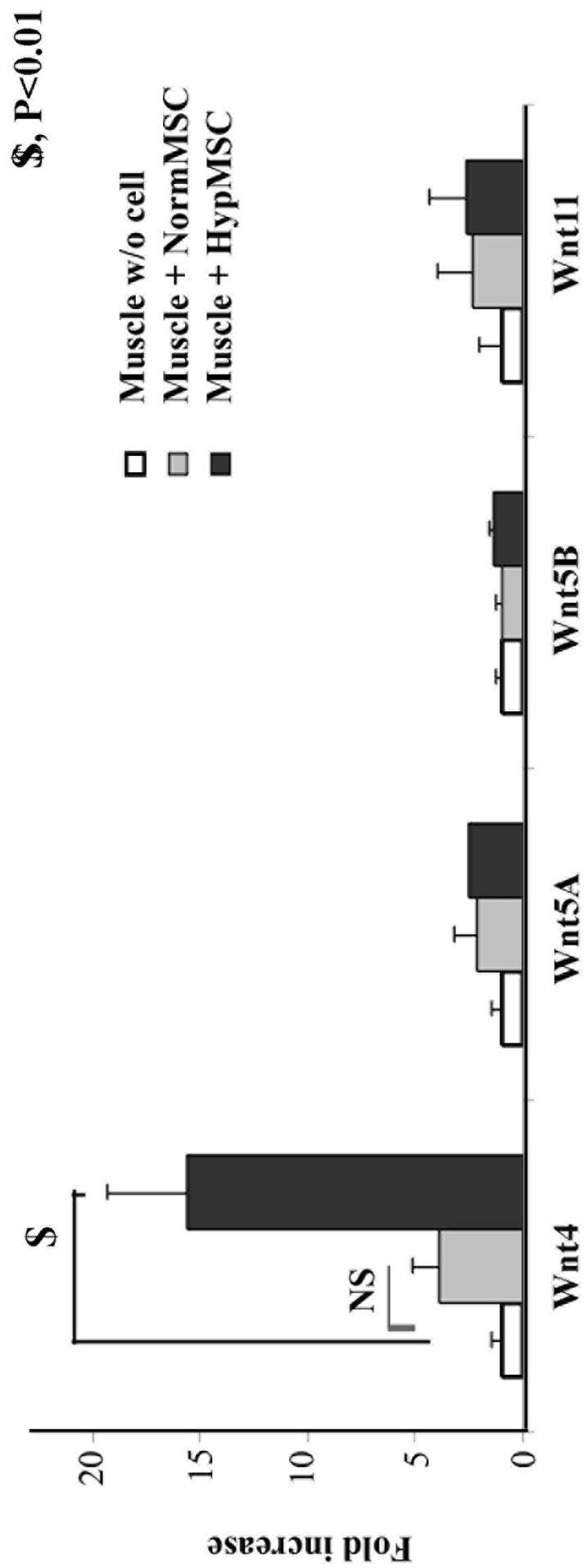


Fig 4

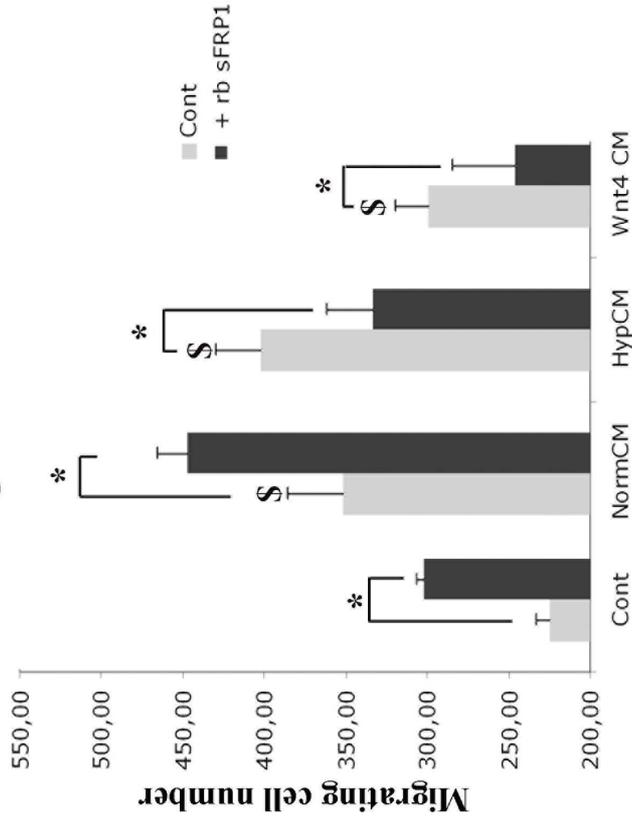


\$, P<0.01

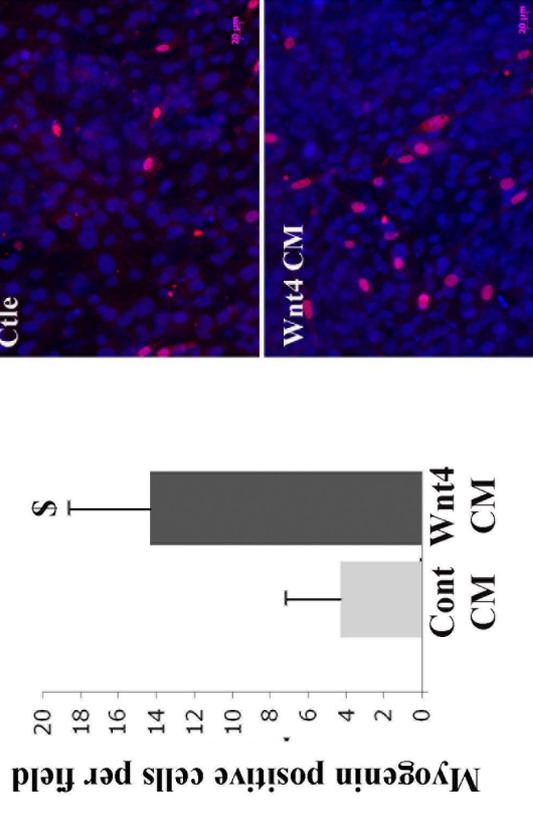
□ Muscle w/o cell
▒ Muscle + NormMSC
■ Muscle + HypMSC

Fig 5

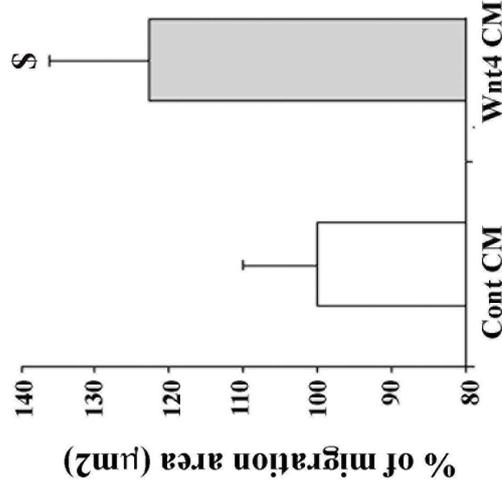
A- EC migration



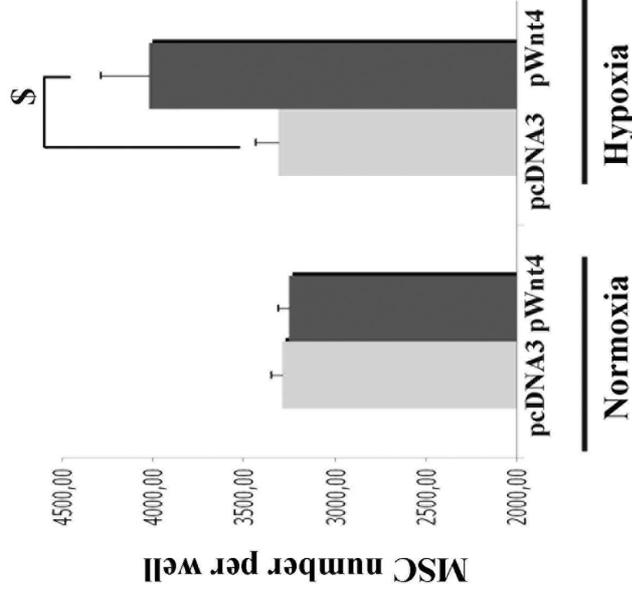
B- Myoblast differentiation



C- MSC migration



D- MSC proliferation



E- MSC Top luciferase induction

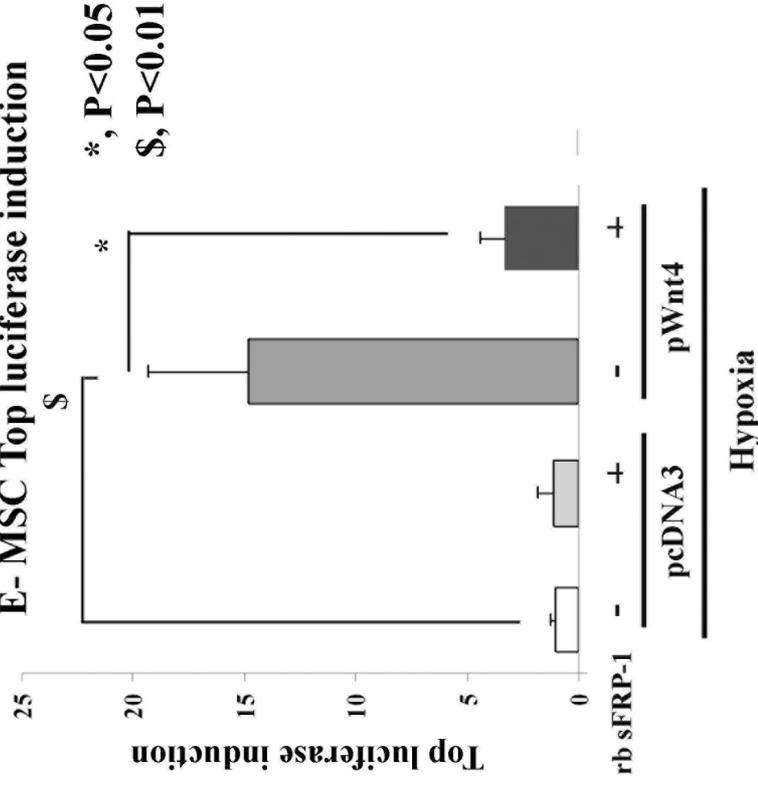
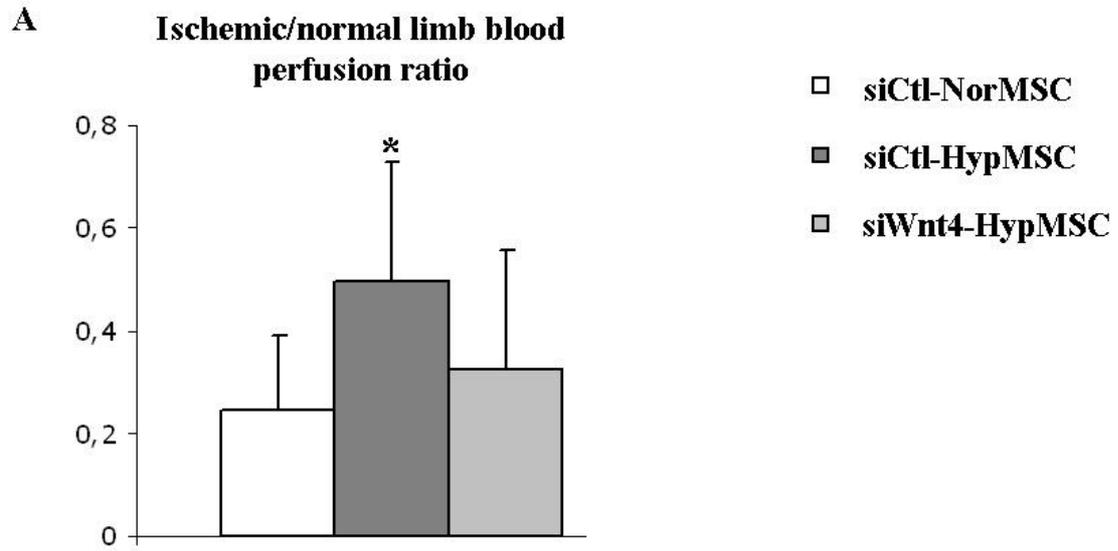
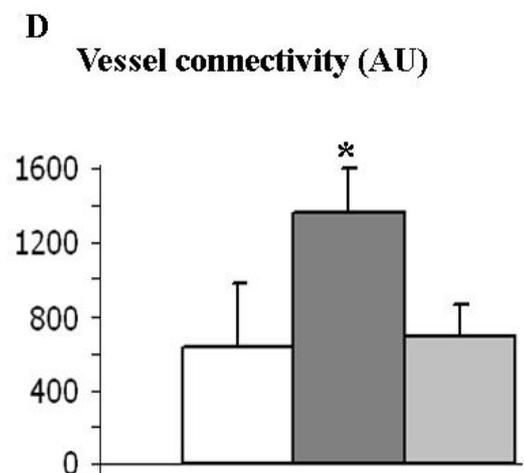
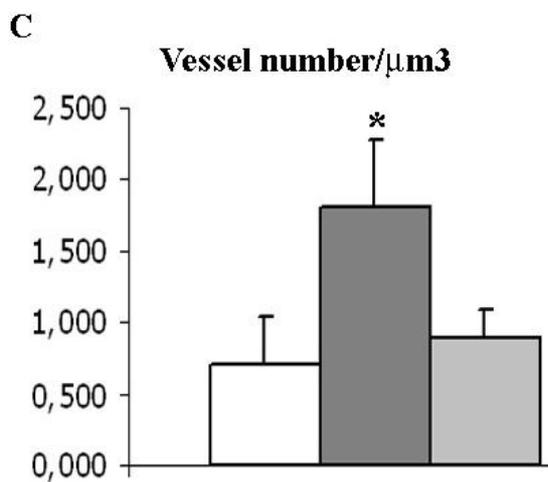
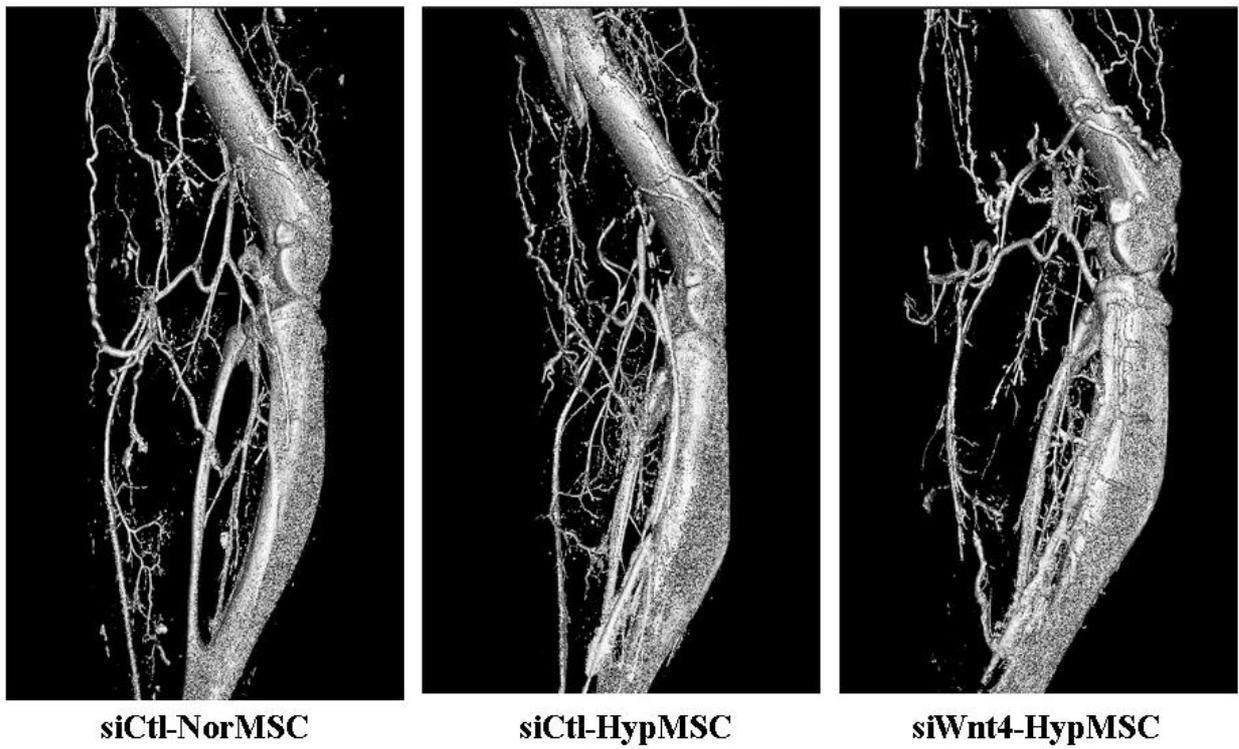


Fig 6



B



ONLINE SUPPLEMENT

DETAILED METHODS

Cell cultures and transfection

- Harvest and culture expansion of murine MSC

Bone marrow cells were harvested by flushing the tibiae and femurs of C57Bl/6J mice (Charles River Laboratories) with DMEM and further purified in Ficoll Paque (Amersham Biosciences, Orsay, France). MSC were characterized using immunostaining as previously described^{1,2}.

Cultured MSC were transduced with pMND-eGFP lentivirus from Trono laboratory (Lausanne, Switzerland) by replacing the medium with fresh medium containing viral supernatant and incubating for 3h at 37°C. Cells were harvested 48 h after the infection and seeded as described here above. MSC were transduced once and retained the fluorescence during the following passages.

For hypoxia treatment, 25×10^3 cells/cm² were seeded onto plastic petri dishes two days prior to experiments. Medium was changed to Optimem (GibcoBrl) and cells were either treated for 24 to 48 hours at 1% O₂ in a hypoxia chamber (HypMSC) (C21 Proox chamber, BioSpherix, New York) or maintained for 24 to 48 hours at 20% O₂ (NormMSC). Hypoxic conditioned media (HypCM) or normoxic conditioned media (NormCM) were obtained immediately after removal respectively either from the hypoxia chamber or from the regular incubator. We have verified that hypoxia treatment did not affect MSC viability using FACS analysis (data non shown).

- EAhy926 and myoblast culture and transfection

EAhy926 cell line and myoblasts (from Dr S. Germain, Inserm U833, France) were cultured in Dubelcco's modified essential medium (DMEM, Invitrogen) with 10% FCS supplemented with L-glutamin and vitamin/gluthation (Invitrogen). In all experiments, Wnt pathway blockade was done with 10 nmol/L estimated rb sFRP-1 protein² or with Dkk1 (R&D). Transfections were performed using Lipofectamine (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. The plasmid encoding the human Wnt4 (pWnt4) were kindly provided respectively by Dr Tsutomu Nohno (University of Hyogo, Hyogo, Japan).

- Preparation of Wnt conditioned media:

Serum free media (SFM) conditioned by CHO cells transiently transfected with the control plasmid pcDNA3.2 (cont CM) or with the plasmid containing human Wnt4 (Wnt4 CM) were assayed for their effects on the proliferation or the migration of MSC, myoblasts and EAHy926.

Mouse model of unilateral hind limb ischemia

Unilateral hind limb ischemia was operatively induced as previously described with the excision of the femoral and saphenous arteries ³. This study was conducted in accordance with both institutional guidelines and those in force in the European community for experimental animal use (L358-86/609/EEC).

Mice were randomly assigned to three treatment groups. One group underwent sham treatment (i.e., aperture and saline injection) (control group). The other groups received injection of either 0.5×10^6 NormMSC or HypMSC. Cell injections were performed 2 days after hindlimb ischemia by direct intramuscular injection into the ischemic thigh and anterior tibialis muscle in multi sites with a 27-gauge needle. Each animal received an intraperitoneal injection of bromodeoxyuridine (BrdU Amersdham, UK) (30 mg/kg) 24 hours prior to sacrifice in order to measure the rate of cell proliferation. Laser Doppler perfusion imaging (Moor Instrument, Wilmington, DE) was used to record serial blood flow measurements over the course of 15 days post operatively as previously described ³. A group of mice were injected with pimonidazole (HypoxyProbe, Chemicon) (1.5 mg/20g intraperitoneously) 1 hour before sacrificing to investigate the hypoxic zones.

Tissue preparation: animals were sacrificed at different time points with an overdose of sodium pentobarbital. For immunohistochemistry, anterior tibialis muscles were fixed in paraformaldehyde (PFA 4%) and embedded in paraffin. For protein or RNA extraction, tissue samples were rinsed in PBS to remove excess blood, snap frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until used.

For microCT scanning: the vasculature was imaged with a high-resolution micro-CT imaging system (GE eXplore Locus SP), set to a 0.016-mm effective detector pixel size. The apparatus used for imaging the vessels was the eXplore Locus Micro-CT scanner from General Electric Healthcare®

with spatial resolutions of 36 to 7 μm , and used with the Scan Control® and Reconstruction Utility® programs. Data were acquired in an axial mode covering a single hindlimb as previously described⁴. The quantification parameters were obtained using the Microview ABA® program. We then delineated and digitally deleted the bones of the hind limb and used the density of our contrast medium as a reference for the program.

For each muscle, necrosis and regeneration measurements were done on cross-sections chosen at regular intervals spanning a 2 mm muscle segment. Entire cross-sections were evaluated on low power field images and zones were measured using Sigma scan pro software.

All parameters were expressed as % positive area per cross-sectional muscle area. Necrotic zones showed signs of massive tissue degeneration. Myofibers with pale cytoplasm and loss of peripheral nuclei were defined as necrotic as previously described⁵; zones in repair were defined by the presence of multinucleated skeletal muscle; repaired muscles after ischemia were characterized by the smaller size of the fibers and the presence of centrally located nuclei defined by the presence of skeletal fibers with a central nucleus; they are typically found in the middle of muscle area in repair (Fig1 Q-R) ⁶.

Immunohistochemistry tissue preparation.

Five-micron, paraffin-embedded sections were cut transversely from the mouse muscle. The following antibodies were used against CD-31 (BMA biomedical), SMA (Sigma), NG2 (Chemicon), GFP (Invitrogen), and BrdU (Harlan SERA-LAB, England). Capillary and arteriole densities were recorded respectively as the number of CD31 positive capillaries and SMA-positive arterioles per mm^2 . Double BrdU/GFP positive blood vessels were quantified, and results were expressed as the percentage of double stained/total GFP positive cells in each condition. A minimum of 30 randomly chosen pictures were recorded at 20X magnification under a microscope for each animal at each time point with a camera connected to a PC. Positive cells were manually counted on captured images and the data were analyzed with the help of Sigma Plot software. All analysis was performed by an investigator blinded to treatment groups.

Bound pimonidazole was detected in paraformaldehyde-fixed, paraffin embedded tissues with a biotin-streptavidin-peroxidase indirect immunostaining method ⁷. Immunodetection was carried out using a Ventana Discovery automat for Pimonidazole and GFP detection on paraffin sections. Briefly, slides were deparaffinized and treated with protease 1 (Ventana) for 30 min before incubating with antibodies at 37°C for 30 min. Slides were then incubated with corresponding biotinylated secondary antibodies before staining with DAB using DaBMap kit (Ventana).

Quantitative RT-PCR

Total RNA from MSC and anterior tibialis muscle was isolated with Tri reagent (Euromedex) and DNase (Promega) according to the manufacturer's protocol. RNA from each sample was reverse transcribed as described ². PCR was done using IQ SYBR Green supermix (Bio-Rad). An MJ Research Opticon and the following parameters were used for real time PCR: 95°C for 5 min followed by 35 cycles of 95°C for 15s, 60°C for 20s and 72°C for 15s. All experiments were done in triplicate and differences in cDNA input were "compensated" by normalization to expression of P0. Primers used were for VEGF forward 5'- CTCCAGGGCTTCATCGTTA -3', reverse 5'- CAGAAGGAGAGCAGAAGTCC -3'; TGFb forward 5'- GCTAATGGTGGACCGCAACAAC -3', reverse 5'- CACTGCTTCCCGAATGTCTGAC -3'; bFGF forward 5'- CCAAGCAGAAGAGAGAGGAGTTGTG -3', reverse 5'- TGCCCAGTTCGTTTCAGTGC -3'; Angiopoietin 1 forward 5'- GCACGAAGGATGCTGATAACGAC -3', reverse 5'- TGATTTTGTCCCGCAGTGTAGAAC -3'; Angiopoietin 2 forward 5'- GCACAAAGGATTCGGACAATGAC -3', reverse 5'- GTTCTTCTGGTAGTGTAGGCAGGC -3'; PDGFB forward 5'- TCTTCCTTCTCTGCTGCTACC -3', reverse 5'- CCCCATCTTCATCTACGGAGTCTC -3'; Wnt4 forward 5'- TTCACAACAACGAGGCTGGCAG -3', reverse 5'- CACCGTCAAACCTTCTCCTTTAGCG -3'; Wnt5A forward 5'- GGCATCAAGGAATGCCAGTA -3', reverse 5'- GTACGTGAAGCCGTCTCTC-3'; Wnt5B forward 5'- CTCCTGAAAATGGAGCCAGC -3', reverse 5'- TTGGTCCCCAGTCAAACCC-3'; Wnt11 forward 5'- GTAGGGCCTTCGCTGACAT -3', reverse 5'- CGATGGTGTGACTGATGGTG -3'. The results were analyzed using the comparative C_t method.

Quantification of MSC in vivo :

To determine the percentage of GFP positive MSC in the muscle, the percent of GFP remaining gene expression was assessed with real time RT-PCR using the comparative C_T method ($\Delta\Delta C_T$). The sample is assessed with two assays one that measures the RNA level of the GFP and one that of P0 as an endogenous calibrator. We first harvested the muscles 10 hours after cell graft in the ischemic hind limb. After RNA extraction, GFP transcripts were quantified by PCR to determine the number of GFP positive cells in the muscle (number of engrafted MSC). We found that 5% of NorMSC and 4.5% HypMSC injected were viable at this early timepoint. We then compared the number of viable MSC at day 7 after injury to the number of MSC initially engrafted (i.e. viable) at 10 hours post injection and results are expressed as a ratio of GFP expression (n=3 animals per time per condition). Before, a linear GFP expression curve has been established: 2 000, 10 000, 50 000 and 250 000 MSC were injected in the tibialis (n=3 per conditions). Muscle were harvested, total RNA were extracted and subjected to qRT-PCR for GFP transcript detection. A linear correlation was observed between the fluorescence threshold cycle number (Ct) and the starting quantity of GFP-MSC injected in the muscle suggesting that this method was applicable to quantify MSC in muscle samples harvested at different time point after GFP-MSC injection.

Functional assays

Test MSC ability to phagocyte MSC debris in culture: myoblasts were labeled with PKH dye according to the manufacturers' recommendations (PKH linker kit, Sigma). To obtain myoblast particulate debris, myoblasts in suspension were submitted to 3 rounds of frozen-thawed cycles. GFP-MSC were seeded at a density of 40 000 cells/cm² in 2 cm² labtek. At confluence, MSC were overlaid with either 125 000 intact or PKH-labeled myoblast particulate debris. After 16 hours, cell cocultures were fixed in PFA 4% for 10 min and observed with a confocal microscope.

Cell proliferation assays: MSC or myoblasts were seeded into 24-well plates at 25x10³ cells/well and incubated overnight to allow adhesion with their respectively appropriate medium. Cells were then

either transfected with control plasmid or plasmid coding for Wnt4 or incubated with conditioned media. After 48 hours, total cells were harvested and counted in each well.

Cell migration assays: cell chemotactic migration was carried out with 8 nm-pore size in 12-well Transwell migration chamber (Costar). Membranes were coated at room temperature for one hour with 0.1 % gelatin. Loading of EAhy926 and MSC for fluorescence was accomplished by incubation of cell suspensions in a 10mM solution of the cell permeant, the AM ester of BCECF. EAhy926 and MSC were then plated at 50 000 cells and 100 000 cells/well respectively, for one hour in serum-free medium (SFM) with 0.1% of BSA. After one hour, medium was removed and migration was activated with conditioned media in the lower chamber. After 16h, cells from the upper surface were removed with cotton swab, and migrated cells were lysed in Tris 100mM, PH 8.0, Triton X100 0.1%. Quantification of the fluorescent signal was measured using a fluorimeter with a fluorescent signal set at 530 nm. Migrated cell number was calculated starting from a calculated linear curve. Each experiment was performed in triplicate and migration was expressed as the % of migrating cells compared to control conditions (0.1% BSA).

Migration was also evaluated in the scratch wound assay. MSC or EAhy926, grown to a confluent monolayer in 1% coated gelatin were starved in SFM containing 0.1% FBS. A central scratch was created by scraping cells away with a p200 pipette tip. After removal of debris by washing the wells with PBS, cells were incubated in presence of SFM conditioned medium from cultured MSC or from Wnt4 conditioned media in different oxygen tensions. For each image, migration areas were measured using the Act1 software (Nikon). Each condition was run in triplicate and the assay was repeated three times.

Cell luciferase assay: for top flash assay, MSC were transfected in 24-well plates at $2,5 \times 10^5$ cell/cm² density with super8XTopFLASH or FopFLASH luciferase reporter plasmids (375 ng/well) containing LEF/TCF consensus binding sites (Randal T. Moon laboratory). pRL-CMV (Promega) was cotransfected (90 ng/well) to normalize samples for transfection efficiency (Dual luciferase kit, Promega). Transfections were performed with Lipofectamine 2000 (Invitrogen) reagents according to the manufacturers' recommendations. After 24 hours, the medium was replaced with SFM conditioned medium from MSC cultured in different oxygen tensions. Cells were harvested 24 hours later and

Luciferase activity was determined with a Turner Designs luminometer. The data are presented as the means SD of triplicate well measurements for one representative experiment.

Quantification of differentiation

Myoblasts were incubated during 48 hours with Wnt4 CM or with control CM, washed with PBS, fixed in PFA 4% and immunostained with an antibody against myogenin (SantaCruz). Myogenin-positive cell number were counted per field (n=10 fields per condition in triplicate).

Western Blotting

After cells were rinsed with cold PBS, they were lysed for 5 min in RIPA buffer (1% Nonidet P-40, 0.5% deoxycholate, 0.1% SDS, 50 mM Tris, pH 8.0, 1mM aprotinin, 1mM AEBSF, 1mM benzamidin, 1mM orthovanadate). 50 µg of protein, quantified by BCA bicinchoninic acid assay (Pierce) were separated by SDS/PAGE and were transferred onto PVDF membranes (Millipore). The membrane was incubated with the polyclonal antibody against VEGF (Santa Cruz) was used. Binding of antibodies to the blots was detected using a chemiluminescence ECL Western-blotting system. Relative protein levels were quantified using Scion software (Scion Corporation) on scanned films.

Immunofluorescence and confocal microscopy

To evaluate *in vivo* GFP-MSC localization and differentiation and for *in vitro* MSC macrophage activity, tissue samples were analyzed with with a confocal microscope (Olympus FV 1000). using a 60x/1.4 ApoPlan oil immersion objective. Single XY scans had an optical slice thickness of 0.4mm. Visualisation was obtained after digitized image multichannel deconvolution by Autodeblur (Media Cybernetics Inc., MD 20910 USA) and three-dimensional projections were digitally reconstituted from stacks of confocal optical slices by Imaris software (Bitplane) (Bitplane AG, Zurich, Swizerland).

Suppression of Wnt4 by siRNA:

GFP-MSC were transfected with 30 nM of mixed siRNA for Wnt4 or with 30 nM siRNA negative control (siCtl) using Interferin (Polyplus, Ozyme) diluted in serum medium. The oligonucleotides used were two HP validated predesigned siRNAs by Qiagen against the following target sequences for Wnt4 gene (accession number: NM-009523) (5'- CCGGGAGGCGGCCTTTGTATA-3' and 5'-CCGGGCACTCATGAATCTTCA-3'). Scrambled SiCtl were synthesized by Eurogentec. Then, siRNA transfected GFP-MSC were either maintained in normoxia condition or in hypoxia condition before being injected. We have verified that HypMSC treated with mixed siRNA against Wnt4 had a 70 % decrease in *Wnt4* mRNA expression after 48 hours of exposure to siRNA (data non shown).

Statistical methods:

All analyses were performed using appropriate software (Statview 5.1). Comparisons of continuous variables between two groups were made using one-way ANOVA and, if a statistically significant difference was observed, a two-sided paired t test. For small samples sizes comparison, a Wilcoxon and Mann–Whitney U tests were used, A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

REFERENCES

1. Derval N, Barandon L, Dufourcq P, Leroux L, Lamaziere JM, Daret D, Couffinhal T, Duplaa C. Epicardial deposition of endothelial progenitor and mesenchymal stem cells in a coated muscle patch after myocardial infarction in a murine model. *Eur J Cardiothorac Surg*. Aug 2008;34(2):248-254.
2. Dufourcq P, Leroux L, Ezan J, Descamps B, Lamaziere JM, Costet P, Basoni C, Moreau C, Deutsch U, Couffinhal T, Duplaa C. Regulation of endothelial cell cytoskeletal reorganization by a secreted frizzled-related protein-1 and frizzled 4- and frizzled 7-dependent pathway: role in neovessel formation. *Am J Pathol*. Jan 2008;172(1):37-49.
3. Ezan J, Leroux L, Barandon L, Dufourcq P, Jaspard B, Moreau C, Allieres C, Daret D, Couffinhal T, Duplaa C. FrzA/sFRP-1, a secreted antagonist of the Wnt-Frizzled pathway, controls vascular cell proliferation in vitro and in vivo. *Cardiovasc Res*. Sep 1 2004;63(4):731-738.
4. Tirziu D, Moodie KL, Zhuang ZW, Singer K, Helisch A, Dunn JF, Li W, Singh J, Simons M. Delayed arteriogenesis in hypercholesterolemic mice. *Circulation*. Oct 18 2005;112(16):2501-2509.

5. Shireman PK, Contreras-Shannon V, Ochoa O, Karia BP, Michalek JE, McManus LM. MCP-1 deficiency causes altered inflammation with impaired skeletal muscle regeneration. *Journal of leukocyte biology*. Mar 2007;81(3):775-785.
6. Aranguren XL, McCue JD, Hendrickx B, Zhu XH, Du F, Chen E, Pelacho B, Penuelas I, Abizanda G, Uriz M, Frommer SA, Ross JJ, Schroeder BA, Seaborn MS, Adney JR, Hagenbrock J, Harris NH, Zhang Y, Zhang X, Nelson-Holte MH, Jiang Y, Billiau AD, Chen W, Prosper F, Verfaillie CM, Luttun A. Multipotent adult progenitor cells sustain function of ischemic limbs in mice. *J Clin Invest*. Feb 2008;118(2):505-514.
7. Samoszuk MK, Walter J, Mechetner E. Improved immunohistochemical method for detecting hypoxia gradients in mouse tissues and tumors. *J Histochem Cytochem*. Jun 2004;52(6):837-839.

SUPPLEMENTAL FIGURE LEGENDS

Supplemental Figure 1: MSC detection : (A) Cell patches at day 7 were found in whole muscle by direct fluorescent imaging. (B) Note the presence of green GFP-positive MSC intercalated between muscle fibers (white arrows).

Supplemental Figure 2: double immunolabelling of GFP and CD31 in ischemic tissues at day 7 and day 15 after injury transplanted with either NormMSC or HypMSC. Confocal acquired images show that GFP-positive NormMSC were frequently found in highly in repair areas at day7 and day 15 although GFP-positive HypMSC were found around necrotic myocytes at day 7 and then at day 15 organized around neo vessels.

Supplemental Figure 3: effects of temporary hypoxia on growth factors and Wnt gene expressions in MSC. VEGF, TGF- β 1, bFGF, Ang1, 2 and PDGFB (A-B), and Wnt4, 5A, 5B and 11 (D) expressions in MSC were followed by performing real-time PCR. MSC were exposed to either normoxic (21% O₂, NormMSC, gray bars) or hypoxic (1% O₂, HypMSC, black bars) conditions for 48 hours. Values are means \pm SD; n=3; the assays were carried out in triplicate. *, P<0.05, \$, P<0.01 HypMSC vs NormMSC. (C) Western blot analysis of lysates of MSC (control) or MSC exposed during 8 or 24 hours at 1% O₂ atmosphere for VEGF expression. α -tubulin was used for equal loading.

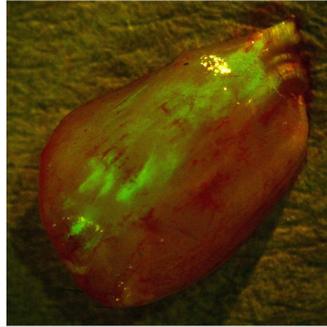
Supplemental Figure 4: effect of HypCM or Wnt4 CM on EC wound migration. Wnt4 CM and HypCM stimulate EC migration in an *in vitro* scratch angiogenesis assay compared respectively to Cont CM and NormCM. Rb sFRP-1 and Dkk1 blocked the HypCM-induced migration. After the wound, EC were maintained either in Wnt4 CM vs cont CM or in HypCM vs NormCM. Analysis of CM effect on wound closure was measured as area of migration (μm^2) on phase contrast microscopy images. *, $P < 0.05$.

Supplemental Figure 5: Hematoxylin and Eosin stained cross section to display necrotic, in repair and repair zones in the muscle after injury. Necrotic zones showed signs of massive tissue degeneration. Myofibers with pale cytoplasm and loss of peripheral nuclei were defined as necrotic (Necrotic zone). Zones in repair were defined by presence of multinucleated skeletal muscle (In repair Zone); repaired muscles after ischemia are characterized by the smaller size of the fibers and the presence of centrally located nuclei defined by the presence of skeletal fibers with a central nucleus (Repair Zone); they are typically found in the middle of muscle area in repair. The zones were measured using Sigma scan Pro software.

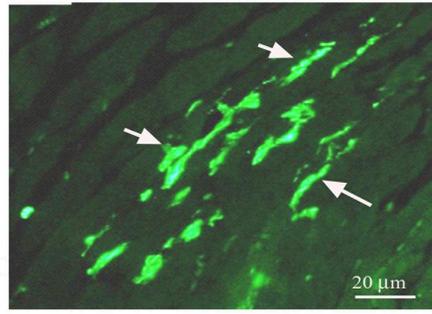
Supplemental Figure 6: Immunofluorescent analysis of MSC for GFP expression (A) after injection and engraftment into hindlimb section at D14, (B) in culture. Nuclei are labeled with DAPI (blue).

Suppl Fig 1

A



B

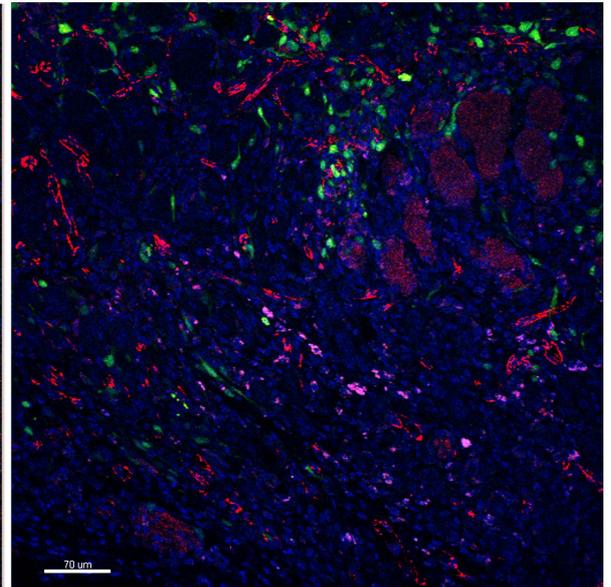
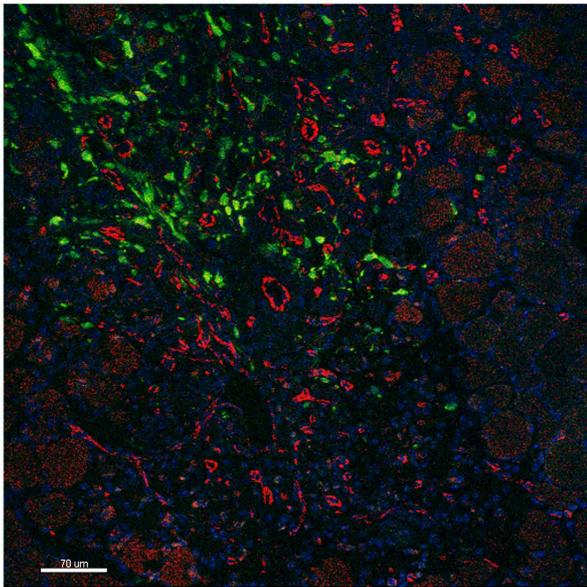


Suppl Fig 2

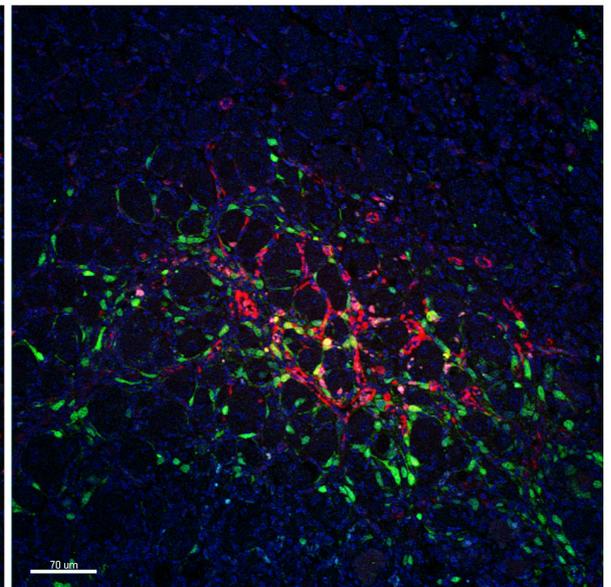
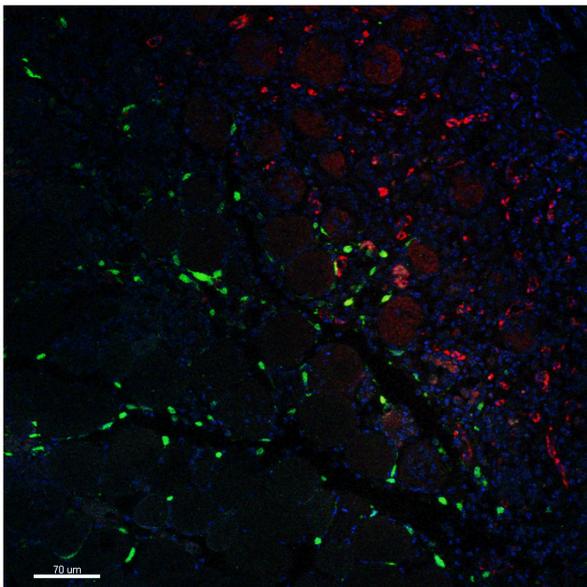
D7

D15

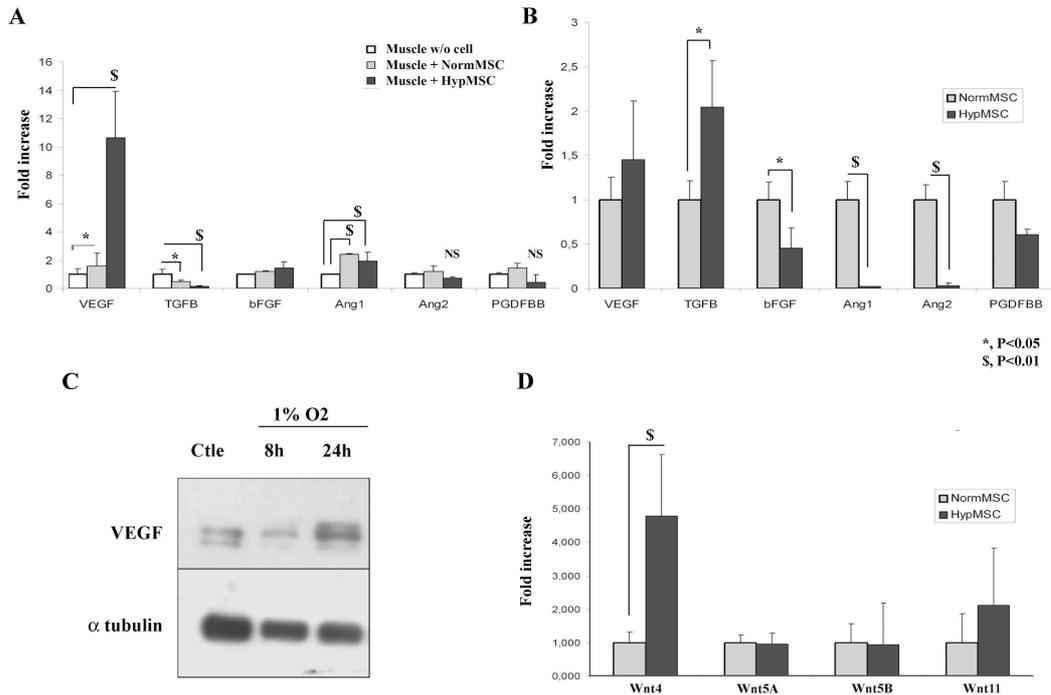
NormMSC



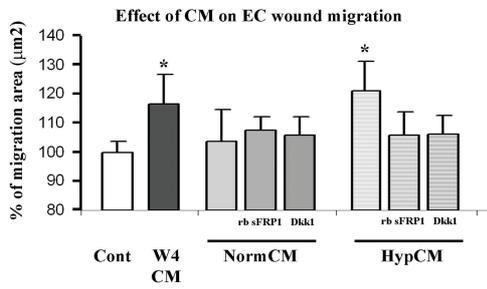
HypMSC



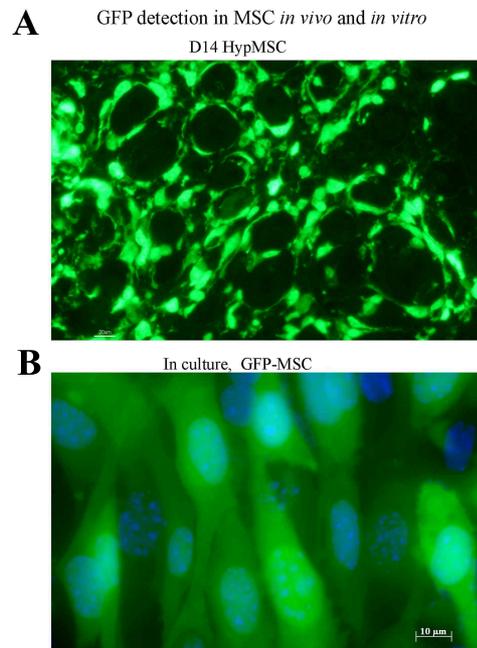
Suppl Fig 3



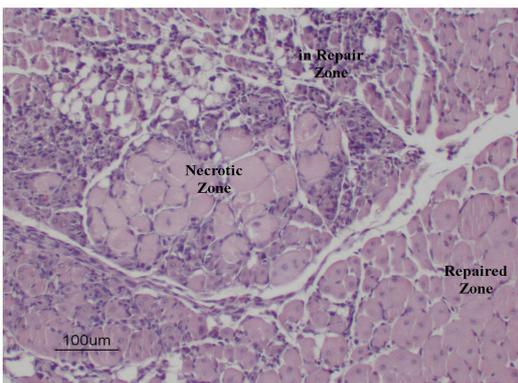
Suppl Fig 4



Suppl Fig 6



Suppl Fig 5



III. Conclusion et discussion

Ces deux études ont mis en évidence un rôle central du système Wnt/Fzd dans la régulation des propriétés angiogéniques des MSC lors de la formation des vaisseaux.

Dans la 1^{ère} étude, nous avons révélé un nouveau rôle structural des MSC dans le processus d'angiogenèse. Certaines études avaient montré un rôle bénéfique thérapeutique de la transplantation de MSC dans des modèles de maladies ischémiques (Nagaya et al. 2005; Shake et al. 2002). Cependant, les mécanismes gouvernant ce processus sont peu clairs. Dans cette étude, nous avons montré que les MSC sont capables de former un réseau primaire précédant le recrutement des CE, en fonctionnant comme des cellules périvasculaires ; elles ne se différencient pas en CE. Ces résultats sont en accord avec une étude qui a démontré que les MSC humaines expriment des marqueurs de CML *in vitro* (Au et al. 2008).

La potentialisation des effets angiogéniques des MSC par la surexpression de sFRP1 dans les MSC est un processus nouveau. sFRP1 augmenterait le contact entre les cellules et améliorerait la maturation et la stabilisation des néo-vaisseaux. On peut imaginer qu'en condition contrôle, les MSC sont en contact avec les cellules voisines, alors que sous sFRP1, la β -caténine reste localisée à la membrane, renforçant les jonctions entre les cellules et améliorant l'intégrité de la couche mésenchymateuse (Dejana 2004).

Dans cette étude, nous avons donc démontré que la modification génétique des MSC avec sFRP1 avant transplantation pourrait être une stratégie prometteuse pour la médecine régénérative d'un tissu ischémique. sFRP1 augmenterait la stabilisation et la maturation des néo-vaisseaux en améliorant le contact entre les cellules.

Dans la 2^{ème} étude, nous avons montré que le préconditionnement des MSC dans 1% d'O₂ avant transplantation est également une stratégie prometteuse dans la médecine régénérative. Dans la thérapie cellulaire, l'efficacité de stratégie de transplantation des MSC est limitée par l'incapacité de maintenir un grand nombre de cellules, après la greffe, dans les sites hypoxiques. Cette perte cellulaire serait due à la sécrétion de cytokines (Noiseux et al. 2006) ou à un rejet immunitaire (Andersson et al. 2003). Dans cette étude, nous montrons que le préconditionnement des MSC en hypoxie maintient le nombre de cellules implantées en améliorant la survie et la prolifération des MSC.

Au site ischémique, les MSC ne se différencient pas puisqu'elles gardent leur propriétés de péricytes et se comportent comme des cellules périvasculaires comme il avait déjà été démontré (Au et al. 2008). Un résultat assez marquant dans cette étude est que les MSC

préconditionnées à l'hypoxie se greffent dans les zones très ischémiques, suggérant que ces cellules joueraient un rôle important dans la régénération tissulaire. Les MSC se comporteraient comme des macrophages et pourraient aider à nettoyer les débris cellulaires du muscle squelettique nécrosé. En effet, les résultats ont montré que les MSC avaient la capacité d'encercler *in vivo* et de phagocyter *in vitro* des myoblastes nécrotiques.

Les MSC jouent également un rôle dans la formation des néo-vaisseaux puisque ces cellules encerclent les CE dans les capillaires et les microvaisseaux, et participent à leur stabilisation. Nous montrons donc à nouveau une fonction murale des MSC lors de l'angiogenèse (Dufourcq et al. 2008), fonction qui avait déjà été démontrée précédemment (Tigges et al. 2008).

Enfin, nous avons établi un rôle pour Wnt4 comme puissant médiateur dans la régénération vasculaire puisque qu'il est fortement exprimé dans les tissus en réparation après injection des MSC hypoxiques ou dans le milieu conditionné des MSC preconditionnées en hypoxie, et qu'il affecte les propriétés de prolifération, de différenciation et de migration des cellules vasculaires. Des études précédentes avaient montré que le milieu conditionné des MSC pouvait promouvoir leur propriétés fonctionnelles (Hung et al. 2007). De plus, un rôle spécifique de Wnt4 avait déjà été décrit sur la différenciation osseuse des MSC, via la voie non canonique (Chang et al. 2007). Ces résultats supportent donc l'hypothèse que la sécrétion du ligand Wnt4 par les MSC au site ischémique joue un rôle important dans la régénération tissulaire.

Le preconditionnement des MSC dans 1% d'O₂ avant transplantation joue donc un rôle critique sur les propriétés des MSC, amenant les cellules à se relocaliser au niveau du site ischémique, facilitant la mobilisation des cellules vasculaires et la régénération des myocytes, et ce, via un mécanisme paracrine dépendant du système Wnt.

Ces deux études démontrent que les MSC représentent un outil angiogénique puissant dans la thérapie cellulaire, et il est clair que les signaux environnementaux, et notamment ceux du système Wnt, ont un impact sur leur potentiel angiogénique. Après accident ischémique, les MSC seraient recrutées au niveau du site hypoxique où elles auraient un rôle structural en entourant les néo-vaisseaux endothéliaux, stabilisant ainsi les structures vasculaires. Les MSC participeraient donc au processus angiogénique en tant que cellules péri-murales. Les études précédentes se sont focalisées sur le recrutement des progéniteurs endothéliaux à partir de la moelle osseuse dans la néo-vascularisation (Asahara et al. 1999; Lyden et al. 2001). Mais de plus en plus de données de la littérature montrent que les péricytes microvasculaires

proviennent également de la moelle osseuse (Rajantie et al. 2004; Song et al. 2005; Tigges et al. 2008), et supportent donc le rôle des MSC en tant que cellules périvasculaires lors de l'angiogenèse.

La potentialisation de ces effets angiogéniques s'effectuerait par la modulation de la signalisation Wnt/Fzd. Plusieurs études ont déjà décrit un rôle de ce système dans le devenir des cellules souches (Deb et al. 2008; Etheridge et al. 2004), ainsi que sur leurs propriétés angiogéniques (De Boer et al. 2004; Neth et al. 2007). D'après ces études, nous pouvons ajouter que sFRP1 potentialiserait le contact entre les MSC et les tubes endothéliaux, et donc la maturation et la stabilisation des néo-vaisseaux, et que la sécrétion de Wnt4 par le préconditionnement hypoxique des MSC jouerait sur les propriétés des cellules vasculaires et favoriserait la régénération tissulaire. La modification génétique des MSC pour surexprimer sFRP1 et le préconditionnement hypoxique en 1% d'O₂ de ces cellules afin qu'elles sécrètent le ligand Wnt4 pourraient donc être deux stratégies proposées pour favoriser des thérapeutiques d'angiogenèse et d'artériogenèse.

Partie II : Implication du récepteur Frizzled 4 dans la régulation de la morphogenèse vasculaire et participation de la protéine centrale Dishevelled

Cette 2^{ème} partie a représenté le projet principal de ma thèse. Dans le but de comprendre les mécanismes favorisant la formation et le maintien de néo-vaisseaux fonctionnels dans un tissu ischémique, ma recherche s'est inscrite dans l'étude des mécanismes de formation et d'organisation des vaisseaux sanguins chez l'adulte. La voie de signalisation Wnt/Fzd est une voie majeure impliquée dans le développement (Eisenberg et al. 2006; Peifer et al. 2000) et lors de la formation tumorale (Reya et al. 2005). Le laboratoire a montré l'importance de ce système dans le domaine cardiovasculaire (Barandon et al. 2003; Dufourcq et al. 2008; Ezan et al. 2004). Au cours de ma thèse, je me suis plus particulièrement intéressée au rôle du système Wnt/Fzd dans la morphogenèse vasculaire.

Le laboratoire avait criblé plusieurs récepteurs Fzd afin d'étudier le rôle de ces récepteurs dans la régulation des propriétés des CE. Deux récepteurs d'intérêt en sont ressortis, Fzd4 et Fzd7, pour lesquels nous avons montré un rôle dans la régulation des propriétés d'étalement des CE. Cette étude, qui sera décrite ci-après, a fait l'objet d'un article auquel j'ai participé (Dufourcq et al. 2008).

A partir de cette étude, mon projet a été d'impliquer un de ces deux récepteurs Fzd dans la formation vasculaire. Je me suis ainsi plus particulièrement intéressée au récepteur Fzd4, dont les souris transgéniques délétées pour le gène codant pour *fzd4* avaient été générées par l'équipe de Nathans (Baltimore, USA). L'implication de Fzd4 dans le développement vasculaire a été étudiée par l'utilisation de ces souris transgéniques, et a montré que les souris délétées pour le gène *fzd4* présente une malformation du réseau vasculaire rétinien secondaire et tertiaire (Xu et al. 2004). Ce phénotype, apparenté à la maladie de FEVR (Vitréorétinopathie Exsudative Familiale), se caractérise par une vascularisation incomplète au niveau de la rétine périphérique et correspond à une mutation du gène *fzd4* chez l'homme (Kondo et al. 2003; Robitaille et al. 2002). De plus, les souris délétées pour *fzd4* ne sont pas non plus fertiles. La délétion de *fzd4* engendre une altération de la formation du corps lutéal, associée à des défauts structuraux du réseau vasculaire (Hsieh et al. 2005). L'implication de Fzd4 dans le développement vasculaire émerge donc depuis quelques années maintenant, mais son rôle dans la formation des vaisseaux reste encore à éclaircir.

L'obtention de ces souris de l'équipe de Nathans m'a ainsi permise d'étudier le rôle de Fzd4 dans la régulation de la morphogenèse vasculaire. Mon principal travail expérimental s'est alors organisé autour des questions suivantes :

- (1) Est ce que Fzd4 régule la morphogenèse vasculaire ?
- (2) Quels sont les cibles cellulaires et les partenaires intracellulaires induits via Fzd4 ?

La majeure partie de ma thèse a permis de répondre à la 1ère question, en déterminant (i) si Fzd4 était impliqué dans la formation de vaisseaux, et (ii) si Fzd4 agissait directement sur les cellules vasculaires (CE et CML) pour réguler cet effet angiogénique. Pour cela, un phénotypage vasculaire des souris délétées pour le gène *fzd4* a été réalisé. L'isolement de cellules vasculaires primaires à partir de souris sauvages et de souris délétées pour *fzd4* a ensuite permis d'étudier l'implication de Fzd4 sur les propriétés angiogéniques de ces cellules.

Nous avons ensuite voulu comprendre les mécanismes moléculaires de la signalisation engendrée par Fzd4 dans les cellules vasculaires. C'est pourquoi je me suis plus particulièrement intéressée à la protéine centrale du système Wnt/Fzd, Dishevelled, afin d'étudier les 3 isoformes de Dvl dans la signalisation induite par Fzd4, et d'essayer d'établir une spécificité d'action entre un isoforme de Dvl et Fzd4. Nous voulions également rechercher, par une méthode de double hybride, des partenaires intracellulaires d'un des isoformes de Dvl, l'isoforme 3. L'étude de Dvl et de ses partenaires intracellulaires présente à ce jour quelques résultats préliminaires qui seront illustrés.

I. Implication de Frizzled4 dans la régulation des propriétés des cellules vasculaires

Cette première étude au laboratoire à laquelle j'ai participé au début de ma thèse a permis de mettre en évidence l'implication de Fzd4 dans la régulation des propriétés d'étalement des cellules vasculaires. Cette étude est décrite ci-dessous.

Article III

Regulation of endothelial cell cytoskeletal reorganization by a secreted frizzled-related protein-1 and Frizzled 4- and Frizzled 7-dependent pathway

Le processus angiogénique est complexe, et implique la prolifération et le mouvement des CE via la coordination de multiples facteurs angiogéniques, de récepteurs, de voies de signalisations intracellulaires et de facteurs régulateurs. Depuis quelques années, les protéines Wnt et leurs récepteurs Fzd ont été reconnus comme signaux extracellulaires régulant la formation des vaisseaux sanguins. Les antagonistes de la voie, tel que sFRP1, qui sont capables de se lier aux Wnt et Fzd (Bafico et al. 1999), ont aussi été impliqués dans la régulation de l'angiogenèse. Différentes études au laboratoire ont d'ailleurs montré le rôle puissant de sFRP1 en tant que facteur angiogénique. Elles avaient tout d'abord mis en évidence que la surexpression de sFRP1 empêchait la signalisation Wnt/ β -caténine durant les phases précoces de l'angiogenèse, et retardait ainsi la prolifération des cellules vasculaires (Ezan et al. 2004). De plus, sFRP1 favorisait la migration et la différenciation des CE, les protégeait de l'apoptose *in vitro*, et amenait à la formation d'un réseau vasculaire dans différents modèles angiogéniques tels que les tumeurs ou les implants sous-cutanés (Dufourcq et al. 2002).

A partir de ces données, le but de cette étude a été d'étudier le rôle de sFRP1 dans la formation vasculaire *de novo* et de comprendre les mécanismes mis en jeu.

Lors de la formation des vaisseaux sanguins *de novo*, la réorganisation des CE en tubes endothéliaux requiert des signaux extracellulaires qui vont jouer sur l'organisation du cytosquelette et la morphologie des CE. L'étalement des CE est une fonction essentielle à ce processus. Dans cette étude, nous avons montré que sFRP1 induisait l'étalement des CE en régulant la réorganisation du réseau d'actine et la formation des contacts focaux. Cet étalement est matrice-dépendant et implique l'activation des intégrines $\alpha_2\beta_1$. Les petites GTPases Rho sont connues pour être impliquées dans l'organisation du cytosquelette des cellules, et nous avons en effet démontré que Rac1 était activée sous l'induction de sFRP1.

De plus, le mécanisme par lequel sFRP1 induit l'étalement des cellules ne semble pas impliquer la voie Wnt/ β -caténine, mais met en jeu la machinerie de la GSK3 β . Nos résultats suggèrent donc que sFRP1 module l'organisation des CE en régulant la dynamique de l'actine, via l'activation de la GSK3 β puis de Rac1.

Ces résultats *in vitro* ont été confirmés *in vivo* en utilisant une approche de transgène. La surexpression de sFRP1 spécifiquement dans l'endothélium (séquences régulatrices du promoteur Tie2) via un système inductible (Doxycycline) augmente la néo-vascularisation du membre inférieur après ischémie de la patte. Cette augmentation de la formation capillaire est corrélée à une activation de la GSK3 β .

Un aspect intéressant dans cette étude a été la mise en évidence des cibles potentielles de sFRP1 dans les cellules endothéliales. L'inhibition par ARN interférence des récepteurs Fzd4 et Fzd7, qui sont exprimés dans les cellules vasculaires, augmente l'étalement des CE de manière semblable aux cellules traitées avec sFRP1. De plus, des expériences d'immunoprécipitation et d'immunofluorescence ont permis de montrer que sFRP1 interagissait et colocalisait avec ces deux récepteurs. Ces résultats traduisaient un mécanisme de régulation négative de Fzd4 et Fzd7 par sFRP1 par la formation de complexes non fonctionnels.

A partir de ces résultats et des données de la littérature, Fzd4 semble être un bon candidat pour promouvoir la morphogenèse vasculaire. Cependant, son rôle dans la formation des vaisseaux et les mécanismes mis en jeu sont encore peu clairs. Nous avons ainsi voulu analyser les conséquences de la délétion du gène codant pour le récepteur Fzd4 dans la formation des vaisseaux.

Cardiovascular, Pulmonary and Renal Pathology

Regulation of Endothelial Cell Cytoskeletal Reorganization by a Secreted Frizzled-Related Protein-1 and Frizzled 4- and Frizzled 7-Dependent Pathway

Role in Neovessel Formation

Pascale Dufourcq,* Lionel Leroux,*[†]
Jérôme Ezan,* Betty Descamps,*
Jean-Marie Daniel Lamazière,* Pierre Costet,[‡]
Caroline Basoni,[§] Catherine Moreau,*
Urban Deutsch,[¶] Thierry Couffinhal,*[†] and
Cécile Duplâa*

From INSERM U828,* Pessac, France; the Centre de Transgenèse,[‡] Université Victor Ségalen Bordeaux 2, Bordeaux, France; the Department of Cardiology,[‡] Hôpital Haut Lévêque, Pessac, France; Institut Européen de Chimie et Biologie (IECB),[§] Pessac, France; and the Theodor Kocher Institute,[¶] University Bern, Bern, Switzerland

Consistent with findings of Wnt pathway members involved in vascular cells, a role for Wnt/Frizzled signaling has recently emerged in vascular cell development. Among the few Wnt family members implicated in vessel formation in adult, Wnt7b and Frizzled 4 have been shown as involved in vessel formation in the lung and in the retina, respectively. Our previous work has shown a role for secreted Frizzled-related protein-1 (sFRP-1), a proposed Wnt signaling inhibitor, in neovascularization after an ischemic event and demonstrated its role as a potent angiogenic factor. However the mechanisms involved have not been investigated. Here, we show that sFRP-1 treatment increases endothelial cell spreading on extracellular matrix as revealed by actin stress fiber reorganization in an integrin-dependent manner. We demonstrate that sFRP-1 can interact with Wnt receptors Frizzled 4 and 7 on endothelial cells to transduce downstream to cellular machineries requiring Rac-1 activity in cooperation with GSK-3 β . sFRP-1 overexpression in endothelium specifically reversed the inactivation of GSK-3 β and increased neovascularization in ischemia-induced angiogenesis in mouse hindlimb. This study illustrates a regulated pathway by sFRP-1 involv-

ing GSK-3 β and Rac-1 in endothelial cell cytoskeletal reorganization and in neovessel formation. (Am J Pathol 2008, 172:37–49; DOI: 10.2353/ajpath.2008.070130)

The formation of new blood capillaries is an important component of pathological tissue repair in response to ischemia. This angiogenic process is complex, involving endothelial cell (EC) movement and proliferation, requiring spatial and temporal coordination of multiple angiogenic factors, receptors, intracellular signaling pathways, and regulatory factors. Although the early phases of capillary tube formation have been well studied, the final steps of endothelial tube organization remain elusive. Extracellular signals may be involved in regulating endothelial cell morphology through changes in the cytoskeleton organization. Recently, the Wnt proteins and their Frizzled (Fzd) receptors have emerged as an integrative system of extracellular signals within intracellular pathways that regulates blood vessel formation.

The secreted Wnt proteins (19 members in mouse)¹ activate canonical and noncanonical signaling pathways by binding to two types of receptors: Frizzled proteins (Fzd) (10 structurally related proteins in mouse)² and lipoprotein LRP-5/6 receptors.³ The canonical pathway involves nuclear translocation of the β -catenin, which

Supported by The European Vascular Genomics Network (grant 503254), the Fondation de France (grant 2006005678), the Groupe de Réflexion pour la Recherche Cardiovasculaire (to L.L.), and the Fondation pour la Recherche Médicale (to L.L.).

P.D., L.L., and J.E. contributed equally to this study.

Accepted for publication October 2, 2007.

Supplemental material for this article can be found on <http://ajp.amjpathol.org>.

Current address of J.E.: Mount Sinai School of Medicine, Molecular, Cell and Developmental Biology Department, New York, NY.

Address reprint requests to Cécile Duplâa, INSERM U828, Av du haut Lévêque, 33600 Pessac, France. E-mail: cecile.duplâa@bordeaux.inserm.fr.

forms complexes with the TCF/LEF-1 transcription factors and activates the expression of various genes.⁴ The non-canonical pathway implicates the cell polarity pathway (PCP), which guides cellular movements during gastrulation, and the Wnt/Ca²⁺ pathway as evidenced in *Xenopus* and Zebrafish.⁵ The Wnt pathway antagonists can be divided into two functional classes: the sFRP family and the Dickkopf protein family.⁶ The sFRP proteins are able to bind either to the Wnt ligands or to the Fz receptors.⁷

Genetic studies in mice have provided insights into the knowledge of Wnt/Fz molecular players that regulate the growth of blood vessels in the embryo. Following are a few examples of the consequences of the inactivation of those molecular factors. Inactivation of *Fzd5* alters vessels in the yolk sac and in the placenta of the embryo.⁸ Inactivation of the *Fzd4* gene reveals a malformation of the secondary and tertiary retinal vascular network.⁹ Inactivation of the *Wnt2* gene causes alterations of the placenta formation.¹⁰ Mice with a deletion of the *Wnt7b* gene display altered hemorrhagic vessels in the lung.¹¹ In the adult, activation of the Wnt signaling pathway has been observed in newly formed vessels.^{12,13} The mechanisms by which Wnt signaling is involved in vessel formation are not obvious. The Wnt factors are known to activate a β -catenin-dependent pathway, inducing transcription of target genes capable of stimulating vessel formation, ie, cyclin D1, *c-myc*, MMP7, and vascular endothelial growth factor. In previous studies, we have shown that sFRP-1 overexpression, during the early phase of angiogenesis, impedes the β -catenin pathway and delays vascular cell proliferation.¹⁴ We have also demonstrated that sFRP-1 favored EC migration and differentiation, protected ECs from apoptosis *in vitro*, and led to a robust vessel formation in different angiogenic models (eg, tumoral, plug, chorioallantoic membrane assays).¹⁵ Its role in vessel formation remains to be elucidated.

In this study, using genetic and biochemical approaches, we have begun a molecular characterization of an unexplored β -catenin-independent Wnt/Fzd signaling pathway functioning in ECs through Fzd receptors and Rac-1. Our findings demonstrate that sFRP-1 is essential to the regulation of EC spreading as revealed by an increase in EC focal contact and actin stress fiber formation in a GSK-3 β - and Rac1-dependent manner. Furthermore, *Fzd4* and *Fzd7* depletions phenocopy sFRP-1-induced EC spreading, revealing that sFRP-1 could regulate the endothelial cell spreading through Fzd4 and Fzd7 blockade. *In vivo*, EC-specific overexpression of sFRP-1 in transgenic mice blocked inactivation of GSK-3 β and consequently increased neovascularization in ischemia-induced angiogenesis in mice.

Materials and Methods

Endothelial Cell Culture and Transfection

Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) from Clonetics were cultured in EBM-2 complete medium with EGM2 single coat (Clonetics). Porcine aortic endothelial

cells (PAECs) were cultured in F-10 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 2 mmol/L L-glutamine, and penicillin-streptomycin. MS1 murine endothelial cells, a generous gift from Dr. Arbiser (Emory University, Atlanta, GA),¹⁶ were cultured at 33°C in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 5% fetal calf serum (Gibco BRL), 1 mmol/L sodium pyruvate, and penicillin-streptomycin. PAE cell lines expressing N17 Rac under the control of an isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG)-inducible promoter were established previously¹⁷ and cultured in the same medium supplemented with 100 μ mol/L hygromycin B (Calbiochem) and 500 nmol/L puromycin (Calbiochem). Expression was achieved by 5 mmol/L IPTG for N17 Rac-expressing cell lines. Because the recombinant bovine FrzA protein¹⁸ is almost identical to its homologous murine sFRP-1 protein (98% of identity), we chose here to rename FrzA to recombinant bovine sFRP-1 protein (rb sFRP-1). In all experiments, cells were activated with 10 nmol/L estimated rb sFRP-1 protein. Transfections were performed using Lipofectamine (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The plasmids harboring FzCRD-myc-GPI, mouse Fz4-HA, and Fzd7 were kindly provided by Dr. Jeremy Nathans (Johns Hopkins University, Baltimore, MD). The plasmid harboring rb sFRP-1-myc::his was described in Jaspard and colleagues.¹⁹

Cell Attachment and Spreading Assays

Assays were performed with glass slides²⁰ (Labtek-III system; Nalge Nunc International Corp.) coated with polylysine (PL), type I (Coll I) or type IV collagen (Coll IV), and laminin (LM) (Biosource), in phosphate-buffered saline (PBS) at 5 μ g/cm². Cells in serum-free medium were incubated for 15 minutes with or without rb sFRP-1 and allowed to spread for 2 hours at 37°C. After fixation in 2% paraformaldehyde, and permeabilization (0.2% Triton X-100), cells were either stained with hemalun or rhodamine-phalloidin (Molecular Probes) or incubated with a vinculin antibody (Sigma) revealed by a secondary anti-mouse fluorescein isothiocyanate antibody (Beckman Coulter) to assess cell morphology and estimate cell spreading areas. Cell spreading results were expressed as the ratio of spread cells/total adherent cells for each field. Results were expressed as the mean \pm SD of six random fields per counted well (four wells per condition). Each experiment was done in triplicate. Cell spreading area was quantified using Sigma Scan Pro Software (National Institutes of Health, Bethesda, MD). Results are expressed as μ m².

The contribution of integrins to cell spreading was assessed using function-blocking mouse antibodies (Abs) as specified in the text at a concentration of 4 μ g/ml: human α v β 3 (LM609), α 2 β 1 (BHA2.1), and β 1 (6S6) (Chemicon), and a mouse IgG (Sigma) as control. Cells were incubated in suspension with the described Ab for 15 minutes before starting the spreading assay. SB 216763 (10 μ mol/L, Biomol), a GSK-3 β inhibitor, was added 30 minutes before the initiation of the assay.²¹

Confocal Analysis

For immunolocalization of rb sFRP-1, CHO were seeded on glass slides (Labtek-II system, Nalge Nunc International Corp.) and transfected with plasmids harboring Fzd4-HA or Fzd7. Twenty-four hours after transfection, cells were incubated with rb sFRP-1-myc in 20 mmol/L Hepes, 140 mmol/L NaCl, 0.05% Tween 20 at 11°C for 1 hour, further rinsed with the same buffer, and fixed with 2% paraformaldehyde for 10 minutes at room temperature. After saturation in 5% bovine serum albumin with PBS for 1 hour, slides were incubated with an anti-c-myc antibody (1:1000; Upstate) overnight at 4°C, and revealed by a secondary anti-mouse biotinylated antibody. For the second staining, the slides were saturated with 5% bovine serum albumin for 1 hour, and further incubated with antibodies against either anti-HA (dilution, 1:1000; Santa Cruz Biotechnology) or anti-Fzd7 (1:1000; R&D Systems) overnight at 4°C, followed by fluorescent labeling with anti-rabbit or anti-goat Alexa Fluor 568 (Molecular Probes), respectively, for 30 minutes at room temperature. Fluorescence was examined with a confocal microscope (Nikon PCM 2000) using a 60×/1.4 Apoplan oil immersion objective. Fluorescein isothiocyanate/Alexa 568 channels were acquired by simultaneous scanning and images were analyzed with Imaris software (Bitplane AG). Z-stacks were performed with a step size of 0.4 μm .

Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS) Analysis of Integrin Expression

Expression of $\beta 1$ subunit in HUVECs and PAECs was determined by flow cytometry. After a 16-hour serum starvation with 1% fetal calf serum and 0.5% bovine serum albumin, cells were incubated with rs FRP-1 for 4 and 16 hours. Cell flow cytometric analyses were performed on monodispersed endothelial cell suspensions prepared by brief incubation in 5 mmol/L ethylenediaminetetraacetic acid at 4°C as previously described.¹⁴ Cells were incubated with anti-human $\beta 1$ subunit antibody (1:1000; Tebu) for 1 hour at 4°C then with an fluorescein isothiocyanate goat anti-mouse IgG (Amersham) for 30 minutes. Samples were analyzed immediately in a fluorescence-activated cell sorter (FACS analyzer ODAM-ATC 3000).

Recombinant Adenovirus Infection

Different adenoviruses were used for functional studies. Cells in culture were infected at a multiplicity of infection of 100 with 1) adenoviral vectors expressing either β -galactosidase (Ad βgal), wild type (Ad GSK-3 β -WT), constitutively active (Ad GSK-3 β -S9A), and catalytically inactive (Ad GSK-3 β -KM) forms of GSK-3 β (kindly provided by Dr. K. Walsh, Boston University School of Medicine, Boston, MA)²²; 2) Ad N17 Rac or Ad V12 Rac expressing a dominant-negative form (N17Rac) or a constitutively active (V12Rac) of Rac1, respectively, under the control of tetracycline repressor elements and a minimal CMV promoter (tet-mCMV) (gift from Dr. J.M.

Bishop, University of California, San Francisco); 3) a virus constitutively expressing a tetracycline repressor-VP16 fusion protein, which was required to activate expression of the tet-mCMV.²³ For co-infection experiments, the first adenovirus infection was performed 6 hours before the second one. Recombinant adenoviral stocks were generated and provided by the vector core facility of Nantes' (France) University Hospital.²⁴

Western Blotting

After cells were rinsed with cold PBS, they were lysed for 5 minutes in RIPA buffer (1% Nonidet P-40, 0.5% deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate, 50 mmol/L Tris, pH 8.0, 1 mmol/L aprotinin, 1 mmol/L AEBSF, 1 mmol/L benzamide, 1 mmol/L orthovanadate). Fifty μg of protein, quantified by bicinchoninic acid assay (Pierce) were separated by sodium dodecyl sulfate/polyacrylamide gel electrophoresis and transferred onto polyvinylidene difluoride membranes (Millipore). Membranes were incubated with the following antibodies: for the integrin activation, anti-phospho α -PAK and anti- α -PAK (Santa Cruz Biotechnology); for the Wnt/Frizzled pathway: anti-phospho-Ser9-GSK-3 β (Cell Signaling), anti-total-GSK-3 β (Cell Signaling), anti- β -catenin (Sigma), anti-phosphoser9- β -catenin antibodies (Cell Signaling), anti- α tubulin (Sigma), anti-phospho-AKT (Cell Signaling) and anti-AKT (Cell Signaling); for Rac expression: anti-Rac1 (Pierce); for recombinant protein experiments, anti-His (Clontech), anti-Myc (Santa Cruz Biotechnology); for angiogenic factor expression: polyclonal antibodies against vascular endothelial growth factor, angiopoietin-1/2 (Santa Cruz Biotechnology). Binding of antibodies to the blots was detected using a chemiluminescence-enhanced chemiluminescence Western blotting system (Amersham). Relative protein levels were quantified using Scion software (Scion Corporation) on scanned films.

Rac Activity Assays

HUVEC and PAEC cultures grown to confluence were starved overnight in serum-free medium. Cells were incubated with rb sFRP-1 at 37°C for different periods of time (0, 10, 20, 30 minutes) and treated using the EZ-Detect Rac1 activation kit (Pierce) according to the manufacturer's instructions. Briefly, after lysis, cells were incubated with GST-human PAK1-PBD in the presence of a SwellGel immobilized glutathione disk. Proteins were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis on 12% acrylamide gels before Western blotting with anti-Rac1 antibody. Before incubation with the beads, 10 μl were removed from all samples to control for equal loading of total Rac1. The amount of PAK-bound GTPase was normalized to the total amount of GTPase in the cell lysate for the comparison of GTPase activity (level of GTP-bound GTPase) in different samples.

Immunoprecipitation

Transfected CHO cells were washed with PBS, treated 30 minutes at 4°C with 4 mmol/L 3,3-dithiobis-sulfosuccinimidylpropionate (Pierce), washed three times with 50 mmol/L Tris-HCl buffer (TBS, pH 7.4), and detached from the plates with 5 mmol/L ethylenediaminetetraacetic acid/TBS. After centrifugation, the pelleted cells were lysed in buffer A (50 mmol/L Tris-HCl buffer, pH 7.4, 0.5% Nonidet P-40, 0.5% Triton, 1 mmol/L CaCl₂, 1 mmol/L MgCl₂, 2% glycerol, 150 mmol/L NaCl containing protease inhibitors) as described.⁹ The insoluble fraction was removed and the supernatant incubated with anti-His microbeads (μMACS anti-His microbeads; Miltenyi Biotec). The samples were prepared following the manufacturer's instructions by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, transferred to polyvinylidene difluoride membrane (Millipore), and probed with anti-Myc antibody (1:x, mAb 9E10; Santa Cruz).

Analysis of Frizzled RNA by Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) and RNA Interference Assay

Total RNAs were prepared from MS1 EC line in guanidinium thiocyanate buffer, and RT-PCRs were performed as previously described.¹⁸ Negative controls without RT were prepared in parallel for each RNA sample. Semi-quantitative PCR was performed as previously described.²⁵

siRNA were either chemically synthesized for *Fzd 2*, *Fz 4*, and *Fzd 7* genes, (Ambion) or made for *Fz 5* and *Fz 6* genes by *in vitro* transcription using RNA silencer kit (Ambion). Two synthetic 21-nucleotide siRNAs per *Frizzled* gene were designed as follows (sense strand is given): *Fzd 2#1*, 5'-GGAAGUUCUACACUCGUCUTT-3'; *Fzd 2#2*, 5'-GCUAUAAGUUUCUGGGUGATT-3'; *Fzd 4#1*, 5'-GGACCAGGUGAUGAAGAGGTT-3'; *Fzd 4#2*, 5'-GGUGAUGAAGAGUUCCUTT-3'; *Fzd 6#1*, 5'-GGCUAUAAGUUUCUGGGAATT-3'; *Fzd 6#3*, 5'-GGUUUCUUAGAUACUUUGTT-3'; *Fzd 7#1*, 5'-GGUGCAGUGUUCUCCUGAGdTdT-3'; *Fzd 7#2*, 5'-GCCAUACACGGCGAGAAAdTdT-3'. *In vitro* siRNA synthesis has been described elsewhere.²⁶ The *Fzd 5* siRNAs were produced by *in vitro* transcription using the Silencer siRNA cocktail kit. The PCR fragments for *Fzd 5* (using the following primers for *Fzd 5*: sense 5'-AAGGAAGAGAAGGCGAGTGACC-3' and antisense 5'-TAGGGCTGGAGGATGATTAGG-3'; for *Fzd 6*, sense 5'-TATCTCTGCGGCTTCTGGGTTGG-3' and antisense 5'-TCCATTGCTTCTCCTTCAGGC-3') were purified (QIAquick PCR purification kit; Qiagen), subcloned into the vector pGEM-T (Promega) and sequenced. The resulting plasmids were used as templates to prepare siRNA cocktails corresponding to the individual genes according to the manufacturer's instructions. Briefly, 2 μg of linearized plasmid was *in vitro* transcribed by T7 RNA polymerase in a 20-μl reaction volume during 2 hours at 37°C. For annealing of siRNA duplexes, siRNA strands were heated for 5 minutes at 80°C and then slowly cooled to room

temperature. Annealed siRNAs were assessed for double-stranded character by agarose gel (1% w/v) electrophoresis and ethidium bromide staining. Then, 15 μg of dsRNA for each gene of interest was digested with 15 U RNase III for 1 hour at 37°C. RNase III digests long dsRNA into short duplex products ranging from ~12 to 15 bp in length. A siGlo cyclophilin B siRNA (Dharmacon) was used as control. MS1 cells were seeded at a density of 20,000/cm² the day before transfection and they were ~40% confluent at the time of transfection. Transfection was performed in Lipofectamine (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The following optimal siRNA concentrations were used: siRNA *Fzd 2#1*, *Fzd 2#2*, *Fzd 4#1*, *Fzd 2#2* (100 nmol/L), siRNA *Fzd 7#1*, *Fzd 7#2* (60 nmol/L), siRNA *Fzd 5* (40 nmol/L), and siRNA *Fzd 6* (80 nmol/L). Transfection medium was maintained on cells for 6 hours and then removed to be replaced by complete medium. Cells were used for experiments after 48 hours and Frizzled RNA silencing was assessed by RT-PCR to confirm knockdown using the following sense and antisense primers, respectively: *Fzd 1*, 5'-GCAACCTACTTTCTCCCCCTG-3' and 5'-CGTGTGTCTCTCTCACCCATC-3'; *Fzd 2*, 5'-TCAAGGTGCCGTCCTATCTCAG-3' and 5'-GGTGGTGACCGTGAAGAAAGTG-3'; *Fzd 3*, 5'-TGGGGTTTCTCCTTTTAGCC-3' and 5'-GCTTTGCTTCTTTGGTCATCCACC-3'; *Fzd 4*, 5'-TGACAAC-TTTCACGCCGCTCv, 5'-TACAAGCCAGCATCGTAGCCACAC-3'; *Fzd 5*, 5'-CGTTGCCACCTTCTCATTGAC-3' and 5'-GCACCAAGAATCCCAGTGACAC-3'; *Fzd 6*, 5'-TATCTCTGCGGCTTCTGGGTTGG-3' and 5'-TCCATTGCTTCTCCTTCAGGC-3'; *Fzd 7*, 5'-TGTGTCTCTTTTCGCATCCG-3' and 5'-AACCATCTCTCGCCCCAAATC-3'; *Fzd 8*, 5'-CATCTGGTGGGTAATCCTGTCCG-3' and 5'-AGGTTGTCAAGGCTCTGGTTGC-3'; *Fzd 9*, 5'-GAGCTGTGTCTACCGAAAATG-3' and 5'-CCTTCTGCCCTTCTTATCCTG-3'; *Fzd 10*, 5'-TGGTGTGTGTTATGTGGGCAGC-3', 5'-ATCAGGCAGTCAGGTGTCTTGG-3'.

For quantitative analysis of sFRP-1 expression *in vivo*, 500 ng of total RNA from mouse tissues were reverse-transcribed; PCR was done using IQ SYBR Green supermix (Bio-Rad). An MJ Research Opticon and the following parameters were used for real-time PCR: 95°C for 5 minutes followed by 35 cycles of 95°C for 15 seconds, 60°C for 20 seconds, and 72°C for 15 seconds. Negative controls without RT were prepared in parallel for each RNA sample. All experiments were done in triplicate and differences in cDNA input were compensated by normalization to expression of P0. Primers used are as follows: P0 forward primer: 5'-GCGACCTGGAAGTCCAACCT-3', and P0 reverse primer: 5'-CCATCAGCACACAGCCTTC-3', sFRP-1 forward primer: 5'-AAGTCAGGGTGATGGGGGAATCC-3', and sFRP-1 reverse primer: 5'-AAACCATCTCCTCGGATAGGGCAC-3', bov sFRP-1 forward 5'-ATTGAGCATCTCTGTGCCAGCGAG-3', and bov sFRP-1 reverse primer: 5'-AAGACCGACTGGAAGTGGGACAC-3'.

Generation of Transgenic Mice

Two types of transgenic mouse lines were generated. The first type of transgenic mouse line, Tie2 tTA mice,

express a tetracycline-controlled transactivator (tTA) under the control of mouse *Tie2* promoter/enhancer sequences. Several of the six independently raised lines exhibit doxycycline-regulatable transgene expression. Two to three-month-old mice from one of these lines (no. 7770) were used for this study. The second type of transgenic mouse line was produced by microinjection of a construct containing the bidirectional tet-responsive promoter, which allows the simultaneous expression of bovine sFRP-1 and β -galactosidase.²⁵ Two independent mouse lines (lines 11 and 56) were used for phenotypic analysis. Double-transgenic (Tie2-tTA/TRE-bov sFRP-1) mice were obtained by crossing the TRE-bov sFRP-1 mice with the *Tie2*-tTA transactivator mouse strain (Figure 7a). TRE-bov sFRP-1 and Tie2-tTA monotransgenic littermates were not different from wild-type mice (not shown) and TRE-bov sFRP-1 were used as controls. Because male and female mice exhibited the same phenotype, the data were pooled for controls as well as for double-transgenic mice.

For the genotyping, genomic DNA was isolated from mouse tail biopsies using the NucleoSpin tissue kit according to the manufacturer's instructions (Macherey-Nagel) and was analyzed by PCR. *Bov sFRP-1* and *tTA* transgenes were routinely detected, respectively, with the following primers: *bov sFRP-1* forward primer: 5'-TG-TGTCCTCCATGTGACAACGAGC-3', and *bov sFRP-1* reverse primer: 5'-TGAGATGAGTTTTGTTTCGGGC-3', *tTA* forward primer: 5'-GCTGCTTAATGAGGTCGG-3', and *tTA* reverse primer: 5'-CTCTGCACCTTGGTGATC-3'.

To assess whether transgene expression was confined to endothelial cells, experiments were performed on 11.5 dpc embryos (Figure 7b, see below) and on ischemic muscle from 10- to 12-week-old Tie2-tTA/TRE-bov sFRP-1 mice and single transgenic littermates (Figure 7d). β -Galactosidase expression was evaluated by histochemical staining with the chromogenic substrate X-Gal or by immunohistochemical staining using polyclonal antibody anti- β -galactosidase as previously described (Figure 7d, see below).²⁷

Regulated Expression of the *bov sFRP-1* Transgene in *Tie2-tTA/TRE-bov sFRP-1* Mice

To repress tTA-dependent transactivation and *bov sFRP-1* expression, doxycycline was given at 0.2 mg/ml in drinking water bottles containing 2.5% sucrose and wrapped with aluminum foil. The water containing doxycycline was changed every 2 days to avoid precipitation. Doxycycline was started 3 days before the surgery and maintained up to the time of sacrifice. Doxycycline inhibits matrix metalloproteinases,²⁸ which can be associated with alterations in vessel geometry. We found no adverse effects of doxycycline on vessel structure or growth when administered to mice for as long as 2 months. We verified that in littermates, doxycycline treatment had no significant effects on proliferation index or capillary density at any of the time points studied after ischemia (data not shown).

Mouse Model of Unilateral Hindlimb Ischemia

Unilateral hindlimb ischemia was operatively induced as previously described.¹⁴ Exposure was obtained by performing an incision in the skin overlying the middle portion of the left hindlimb in each mouse. The proximal end of the femoral artery and the distal portion of the saphenous artery were both ligated, and the arteries as well as all side branches were excised. Ischemia was performed on binary Tie2-tTA/TRE-bov sFRP-1 or littermate mice with or without doxycycline. After the onset of ischemia, bovine sFRP-1 transcripts and X-Gal-positive cells were detected in many endothelial cells participating in the neovascularization of the ischemic muscle. This study was conducted in accordance with both institutional guidelines and those in force in the European community for experimental animal use (L358-86/609/EEC).

Modulation of Transgene Expression

To understand the specific effect of *bov sFRP-1* overexpression in the late phase of neovascularization after ischemia, doxycycline was started 3 days before the surgery and maintained 6 days after. To induce expression of the transgene, doxycycline was withdrawn from the water and animals were killed at defined time points. Control animals were treated with doxycycline until sacrifice. Previous experiments have shown that sFRP-1 was expressed 2 days after doxycycline removal.

In ischemic muscle, bovine sFRP-1 mRNA expression was completely switched off after 6 or 21 days of doxycycline treatment in Tie2-tTA/TRE-bov sFRP-1 mice, thus indicating the conditional regulation of bovine sFRP-1. This regulation was further confirmed at the protein level by the lack of β -galactosidase-positive cells, as evidenced by X-Gal staining or labeling by the anti- β -galactosidase antibody (data not shown). These results demonstrate a tight suppression achieved by doxycycline on bovine sFRP-1 expression and the low probability of leaky bovine sFRP-1 transgene expression from tTA-mediated transactivation.

Necropsy Examination

Tissue Preparation

Animals were sacrificed at different time points with an overdose of sodium pentobarbital. For immunohistochemistry, anterior tibialis muscles were fixed in methanol and embedded in paraffin. For protein or RNA extraction, tissue samples were rinsed in PBS to remove excess blood, snap-frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until used. A minimum of eight animals was examined for each time point in the littermate group and in the binary Tie2-tTA/TRE-bov sFRP-1 group.

Immunohistochemistry

Five- μm , paraffin-embedded sections cut transversely to the mouse muscle were used for immunohistochemis-

try. Commercially available antibodies were used to detect β -galactosidase (β gal; Chemicon) and endothelial cells (CD-31; Pharmingen). For measurement of capillary density, tissues were prepared as described.¹⁴ Two different sections were taken from each part of the muscle. A minimum of 30 randomized pictures was recorded at $\times 40$ magnification for each animal at each time point on the two sections with a camera connected to a PC. Positive cells were manually counted on captured images, and data were analyzed with Sigma Plot software. Capillary density was recorded as the number of capillaries per mm^2 .

Statistical Analysis

Results are expressed as mean \pm SD. All analyses were performed with appropriate software (Statview 5-1; Abacus). Comparison of continuous variables between two groups was performed by a one-way analysis of variance and subsequently, if statistical significance was observed, by a two-sided paired *t*-test. A value of $P < 0.05$ was considered significant.

Results

sFRP-1-Induced Endothelial Cell Spreading and Cytoskeletal Reorganization Is Matrix-Specific and Integrin-Dependent

Exposure to the recombinant bovine sFRP-1 (rb sFRP-1) protein enhanced the velocity of EC spreading on laminin and type I and IV collagen ($130 \pm 9\%$, $127 \pm 18\%$, and $127 \pm 14\%$, respectively, at 2 hours) (Figure 1a). Interestingly, sFRP-1 failed to induce cell spreading on polylysine, to which cells attach by charge interactions alone suggesting that sFRP-1 influences EC spreading in a matrix-dependent manner. Similar results were observed with PAECs (data not shown).

More strikingly, the surface area of ECs under rb sFRP-1 treatment increased as compared to control conditions (1.9-fold increase) (Figure 1a). This increase in large, flattened cells under rb sFRP-1 stimulation was correlated with a rearrangement of the actin cytoskeleton. rb sFRP-1 treatment of ECs stimulated the formation of actin stress fibers and focal contacts that were detectable, respectively, with phalloidin and vinculin staining (Figure 1b).

As interaction between vinculin and actin filaments is thought to constitute an interface between the cytoskeleton and the integrins,²⁹ we next sought to investigate the involvement of integrin in sFRP-1-induced EC spreading. Although addition of blocking antibody (Ab) for $\beta 1$ - or $\alpha 2\beta 1$ -integrin, completely blocked the sFRP-1-induced HUVEC spreading on both collagen type I (Figure 1c) and laminin (not shown), a function-blocking Ab directed against $\alpha v\beta 3$ -integrin (LM609) did not affect sFRP-1-induced EC spreading on both matrices. These results were confirmed in PAECs (data not shown). Integrin ac-

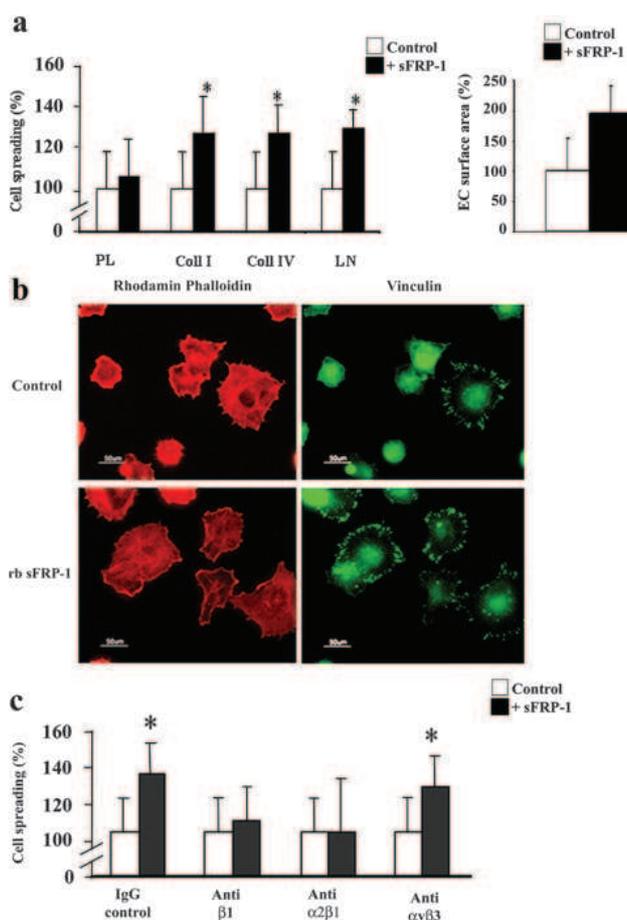


Figure 1. sFRP-1 induces HUVEC spreading on extracellular matrix and promotes HUVEC cell spreading to collagen type I through $\alpha 2\beta 1$ -integrin. **a:** HUVECs were allowed to spread on polylysine (PL), type I collagen (Coll I), type IV collagen (Coll IV), or laminin (LM) in the absence or presence of rb sFRP-1 in serum-free medium for 2 hours. The percentage of spread cells were scored as described in the Materials and Methods section. Cell surface area was quantified in adherent HUVECs after staining by rhodamine-phalloidin. Treatments were performed in triplicate, and results are expressed as mean percent spreading \pm SD. $*P < 0.05$ relative to controls. **b:** F-actin (red fluorescence) and focal adhesion plaque (green fluorescence) distributions were detected in adherent HUVECs after staining with rhodamine-phalloidin or vinculin labeling in the absence (control) (□) or in the presence (■) of recombinant bovine sFRP-1 (+rb sFRP-1). **c:** Spreading assays of HUVECs were performed in the presence of function-blocking antibodies against $\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, and $\alpha v\beta 3$ integrins on wells coated with type I collagen. A mouse IgG served as control. Cells were preincubated for 15 minutes before plating with function-blocking mAbs at a concentration of $4 \mu\text{g/ml}$ in the absence (□) or presence (■) of recombinant bovine sFRP-1. Spreading was quantified by counting the number of spread cells per field as described in the Materials and Methods section ($\times 20$ objective). Results are expressed as mean spreading as percentage of control \pm SD. $*P < 0.05$ relative to controls.

tivation by rb sFRP-1 was showed via a rapid induction of phospho- α -PAK (Supplementary Figure 1, see <http://ajp.amjpathol.org>) in HUVECs. Using FACS analysis, we demonstrated that $\beta 1$ -integrin levels were not modulated on the surface of sFRP-1-treated HUVECs and PAECs, compared to control levels at 4 and 16 hours after cell activation (Supplementary Figure 2, see <http://ajp.amjpathol.org>). sFRP-1 may participate in an inside-outside signaling process that promotes $\alpha 2\beta 1$ -integrin affinity. These data suggest a cooperative effect of sFRP-1 and integrin pathways in ECs.

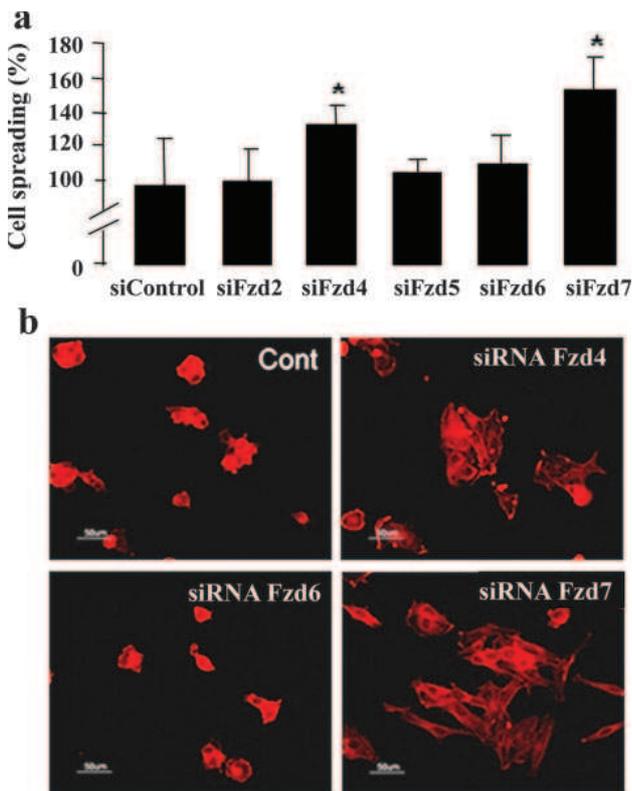


Figure 2. Involvement of Frizzled 4 and 7 in sFRP-1-induced endothelial cell spreading. Forty-eight hours after transfection with siRNA control or indicated Frizzled siRNA (Fzd2, Fzd4, Fzd5, Fzd6, Fzd7), MS1 cells were submitted to a spreading assay on wells coated with type I collagen. **a:** The percentage of spread cells were scored as described in the Materials and Methods section. **b:** F-actin (red fluorescence) distribution in adherent MS1 cells was detected by rhodamine-phalloidin.

Frizzled 4 and 7 Receptors Are Involved in EC Spreading

We then addressed whether EC spreading involved Fzd receptor blockade. Murine EC line MS1 expressed *Fzd2*, 4, 5, 6, and 7 transcripts and a very low level of *Fzd1* transcripts. Noteworthy, the same expression profile was found in HUVECs (Supplementary Figure 1a, see <http://ajp.amjpathol.org>).³⁰ We used siRNA targeted to *Fzd2*, 4, 5, 6, and 7 and showed by RT-PCR that RNA interference assays efficiently decreased the mRNA levels of the distinct Fzd genes (from ~60 to 95% efficiency) (Supplementary Figure 3b, see <http://ajp.amjpathol.org>). siRNA targeting one specific member of the Fzd family did not inhibit the expression of other Fzd members in MS1 cells (data not shown), suggesting a highly specific siRNA effect.

Treatment with control or Fzd2, -5, and -6 siRNA did not modulate EC spreading. In contrast, Fzd4 or -7 depletions dramatically increased EC spreading ($136 \pm 16\%$ and $147 \pm 9\%$, respectively) (Figure 2a) and induced large and abundant flattened ECs as observed after F-actin staining (Figure 2b). These experiments revealed a direct involvement of Fzd4 and Fzd7 in spreading. These results were confirmed on HUVECs (data not shown).

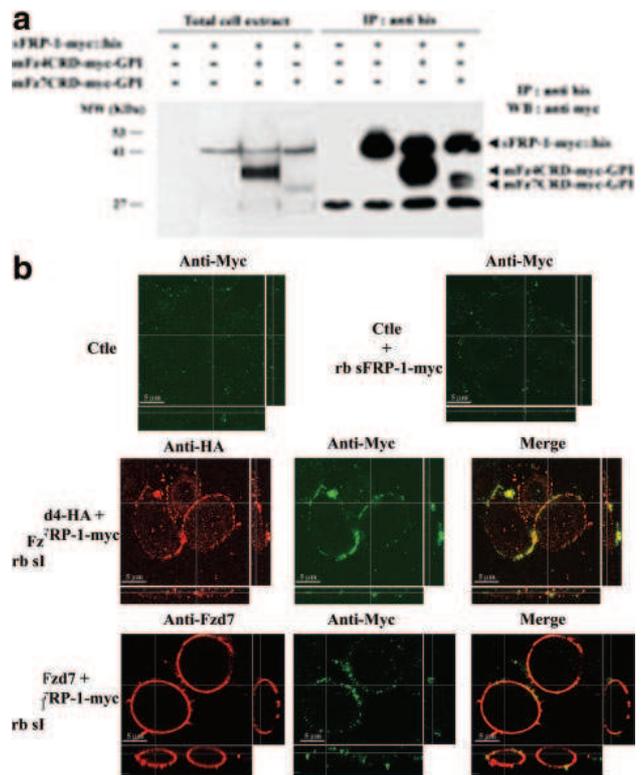


Figure 3. Interaction between sFRP-1 and extracellular domain of Frizzled 4 and Frizzled 7 *in vitro*. **a:** CHO cells were transfected with expression vectors as indicated. Total cell extract (T) were immunoprecipitated (IP) with anti-His tag antibody. The immunoprecipitates were immunoblotted (WB) with anti-myc tag antibody. Positions of specific bands corresponding to bovine sFRP-1-myc::his, mFz4CRD-myc-GPI, or mFz7CRD-myc-GPI are indicated. **b:** CHO cells expressing either Fzd4-HA or Fzd7 or none (Ctle) were incubated with rb sFRP-1-myc for 1 hour. Fzd4 and Fzd7 expressed, as determined by using histochemical detection (red staining), localized efficiently at the cell membrane, and induced accumulation of sFRP-1 puncta (green). This recruitment and co-localization of Fzd4 or Fzd7 with sFRP-1 in puncta could highlight sites of frizzled activity.

sFRP-1 Interacts with Frizzled 4 and 7 Receptors

sFRP-1-treated cells or Fzd4 and Fzd7 knockdown cells presented a similar behavior during spreading assays compared to that of control cells. We thus explored whether sFRP-1 interacts directly with Fzd4 and -7. Addition of rb sFRP-1 to mFzd4CRD-myc-GPI-expressing CHO cells resulted in efficient co-precipitation of mFzd4 protein with the his-tagged sFRP-1. Precipitation of rb sFRP-1 in CHO cells transfected with mFzd7CRD-myc-GPI showed a minor co-precipitation of mFzd7 protein (Figure 3a). To determine the localization of rb sFRP-1 on CHO overexpressing Fzd4 and Fzd7, by confocal microscopy analysis, CHO, transfected with plasmids harboring Fzd4-HA and Fzd7, were incubated with the recombinant protein rb sFRP-1-myc. In the absence of Fzd overexpression (ctle), rb sFRP-1 was poorly detected in CHO in a few plasma membrane puncta (Figure 3b). Transfection of plasmid harboring Fzd4-HA and Fzd7 showed a strong expression and localization of each Fzd at the cell membrane as revealed by a red staining. In the presence of full-length Fzd4 and -7 in CHO, rb sFRP-1 was found in

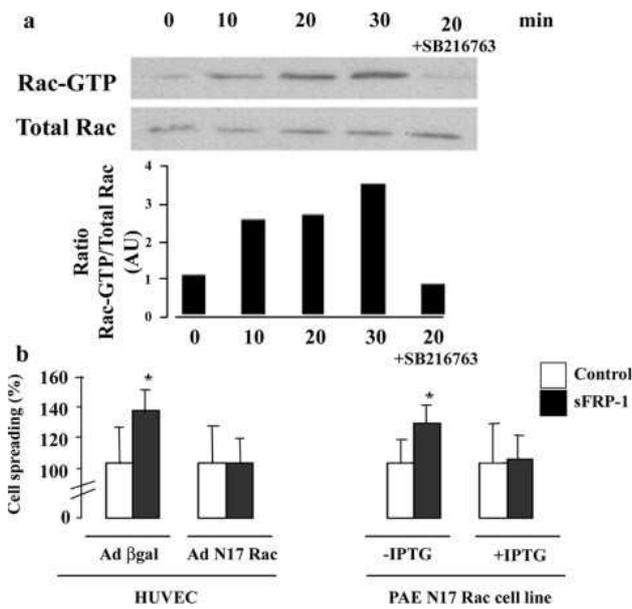


Figure 4. Role of Rac1 in sFRP-1 induced spreading on endothelial cells. sFRP-1 leads to an activation of Rac1, which is required for sFRP-1-induced EC spreading. **a:** Immunoprecipitation using a GST-human PAK1-PBD fusion protein that binds to GTP-bound Rac1 (active form) was used to detect, by Western blotting, the magnitude of Rac1 activation in response to sFRP-1 in HUVECs. Serum-starved HUVECs were exposed or not to recombinant bovine sFRP-1 for the indicated times. Cells were also pretreated with SB 216763 (10 μ mol/L) before stimulation. The results are expressed as Rac GTP/total Rac ratio and are representative of three independent experiments. **b:** HUVECs were infected with adenovirus expressing the β -galactosidase or the dominant-negative form of Rac1 (Ad N17Rac) 18 hours before stimulation with the recombinant bovine sFRP-1. The PAE cell line expressing N17 Rac under the control of an IPTG-inducible promoter was also treated by recombinant bovine sFRP-1. After stimulation, spreading assays on type I collagen were performed as described in the Materials and Methods section. Data are expressed in average percent spreading \pm SD ($n = 3$). * $P < 0.05$ relative to control without recombinant bovine sFRP-1.

regions that co-localized with Fzd4-HA and -7 accumulations as revealed by a yellow coloration (Figure 3b). These rb sFRP-1 accumulations were larger and more uniformly to the plasma membrane in Fzd4-HA-transfected CHO than in Fzd7-transfected CHO confirming our previous observation showing that sFRP-1 binds more efficiently to Fzd4 than to Fzd7. Altogether, these data demonstrate that sFRP-1 interacts with both Fzd receptors and suggest that sFRP-1 is an antagonist of both Fzd4 and Fzd7 receptors.

sFRP-1-Induced EC Spreading Involves Rac1 Activation

The process of cell spreading involves control of the complex dynamic rearrangements of the actin cytoskeleton by members of the Rho GTPase family such as Rac1.^{31,32} Because sFRP-1 modifies cytoskeleton organization, we investigated whether Rac1 could be an effector of sFRP-1 pathway. Pull down assays showed a rapid activation of Rac1 (GTP-Rac) in HUVECs after 10 to 30 minutes of rb sFRP-1 treatments (Figure 4a). Similar results were observed for PAECs (data not shown). The Rac1 dominant-negative mutant adenovirus (AdN17Rac) abolished sFRP-1 effects on HUVEC spreading whereas control adenoviral vector (Ad β gal) did not modify EC

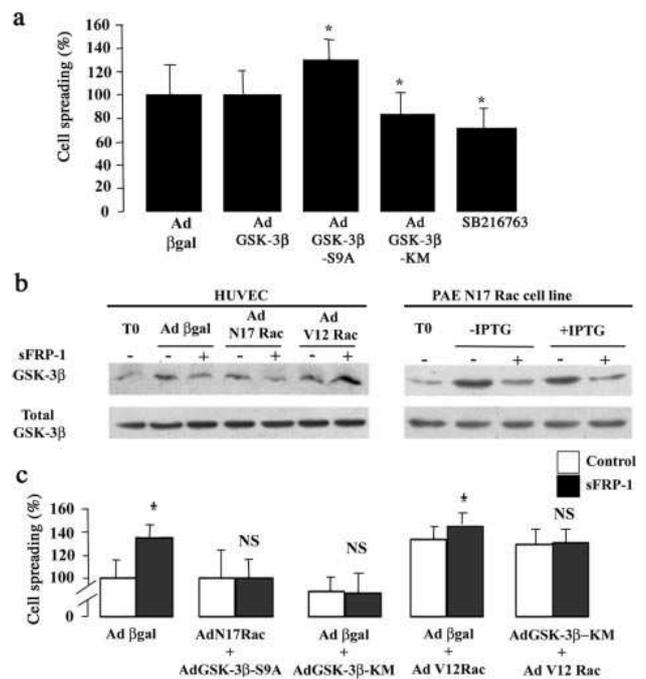


Figure 5. GSK-3 β /Rac-1 pathway involved in sFRP-1-induced EC spreading. **a:** HUVECs were either infected with adenovirus expressing β -galactosidase, GSK-3 β , GSK-3 β -S9A, or GSK-3 β -KM or treated with SB216763. After the treatment, a spreading assay was performed. Data are mean percent spreading \pm SD. * $P < 0.05$ relative to control. **b:** HUVECs infected with adenovirus coding for β -galactosidase or N17Rac or V12Rac and PAE cell line expressing N17Rac under the control of an IPTG-inducible promoter were also treated or not with recombinant bovine sFRP-1 for 30 minutes in serum-free medium. After stimulation, the cellular proteins were analyzed by Western blotting with anti-phospho-GSK-3 β (Ser 9) and total GSK-3 β . The results shown are representative of three independent experiments. **c:** HUVECs were infected in a two-step process: first with adenovirus coding for β -galactosidase, N17Rac, or GSK-3 β -KM, 6 hours before a second infection with adenovirus producing β -galactosidase, GSK-3 β -S9A, GSK-3 β -KM, or V12Rac. Eighteen hours later, cells were treated (■) or not (□) with rb sFRP-1 for 30 minutes in serum-free medium. After stimulation, spreading assays on type I collagen were performed as described in the Materials and Methods section. Data are mean percent spreading \pm SD. * $P < 0.05$ relative to control without recombinant bovine sFRP-1.

response to rb sFRP-1 (Figure 4b). Similar results were observed in a PAE cell line in which overexpression of N17Rac is under the control of an IPTG-inducible promoter (Figure 4b). The activation of Rac1 by sFRP-1 appeared to be critical for EC spreading enhancement.

EC Spreading Requires Cooperative Activation of GSK-3 β and Rac1

Our previous observations and preliminary experiments indicating that rb sFRP-1 abrogated GSK-3 β inactivation by preventing its phosphorylation at Ser9 residue¹⁵ prompted us to examine the involvement of GSK-3 β in EC spreading. HUVECs were thus either transduced with adenoviruses harboring a wild-type (Ad GSK-3 β -WT), a constitutively active, unphosphorylatable form (GSK-3 β -S9A), or a dominant-negative form (Ad GSK-3 β -KM) of GSK-3 β or treated with a selective GSK-3 β inhibitor, SB216763. GSK-3 β -WT overexpression had no effect on EC spreading (Figure 5a). GSK-3 β -S9A overexpression caused a 30% increase in EC spreading (130 \pm 17% compared to

control Ad β gal adenovirus). Both AdGSK-3 β -KM delivery and the pharmacological inhibitor of GSK-3 β decreased the HUVEC's basal spreading level, ie, $83 \pm 18\%$ and $71 \pm 17\%$, respectively, compared with control (Figure 5a). The same results were obtained on PAECs (data not shown). These findings suggest a role for GSK-3 β activation in regulation of EC spreading.

We hypothesized that GSK-3 β and Rac1 could act, in the same pathway, on sFRP-1-mediated EC spreading. We first showed that inhibition of GSK-3 β completely blocked rb sFRP-1-induced EC spreading on type I collagen (Figure 5c). Treatment of cells with the SB216763 inhibitor of GSK-3 β blocked the ability of rb sFRP-1 to activate Rac1 (Figure 4a). Second, we demonstrated that the overexpression of the dominant-negative form of Rac1 (N17Rac) in ECs, either by HUVEC adenovirus (AdN17Rac) infection or by IPTG induction in PAE N17 Rac-inducible cell line, did not affect the level of GSK-3 β phosphorylation by sFRP-1 (Figure 5b). All these data suggest that GSK-3 β was able to act upstream of Rac 1 under sFRP-1 treatment. These results were confirmed when co-expression of N17Rac and GSK-3 β -S9A adenoviruses failed to restore EC spreading in response to rb sFRP-1, demonstrating that GSK-3 β acts upstream of Rac1 in sFRP-1-induced EC spreading (Figure 5c).

Adv12Rac expression resulted in a significant increase of EC spreading compared with Ad β gal-infected ECs, ie, $133 \pm 13\%$ of control, indicating an effect of Rac1 itself on EC spreading (Figure 5c). Moreover, we found an additive effect of sFRP-1 on V12Rac-expressing EC spreading ie, $146 \pm 11\%$ of control (Figure 5c). Taken together, these experiments place Rac1 under GSK-3 β activation in the sFRP-1-dependent signaling cascade that leads to EC spreading.

EC Spreading Is Independent of the Activation of the Wnt Canonical Pathway and Depends on a GSK-3 β Pathway

sFRP-1 is usually considered as a Wnt canonical pathway antagonist. Here, we sought to determine whether sFRP-1 effect on EC spreading was dependent on activation of the Wnt canonical pathway using a β -catenin-deleted EC line.³³ Depletion of β -catenin did not affect sFRP-1 spreading enhancement (Figure 6a), although dominant-negative overexpression of GSK-3 β blocked sFRP-1-induced spreading. These results confirm that the antagonistic function of sFRP-1 is independent of the canonical Wnt pathway but involves GSK-3 β activation.

Correlation of an sFRP-1/GSK-3 β -Dependent Pathway Activation with Vascular Formation

We further sought to test whether induction of the GSK-3 β /Rac-1 pathway plays a role on EC organization during neovessel formation. We took advantage of an inducible approach based on the tTA system³⁴ combined with the Tie2 endothelial cell-specific promoter^{35,36} to regulate

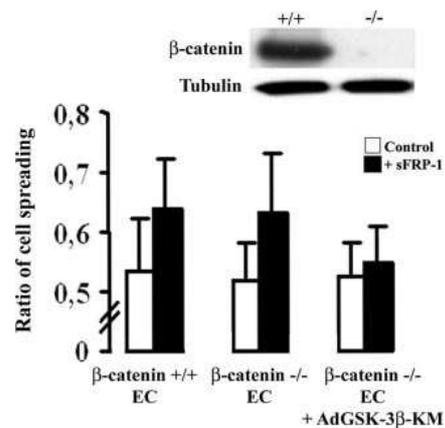


Figure 6. sFRP-1 induction of EC spreading is independent of β -catenin and requires GSK-3 β activation. Endothelial cell lines expressing β -catenin (+/+) or deleted for β -catenin (-/-) as demonstrated by Western blot, were treated (■) or not (□) with rb sFRP-1 for 30 minutes in serum-free medium. The role of GSK-3 β was investigated in ECs deleted for β -catenin by infection of ECs with adenovirus expressing GSK-3 β -KM. After stimulation, spreading assays on type I collagen were performed as described in the Materials and Methods section. Data are mean percent spreading \pm SD. * $P < 0.05$ relative to control without recombinant bovine sFRP-1.

bovine transgene sFRP-1 expression specifically in the EC during vessel formation (Figure 7a).

We used inducible Tetoff transgenic mice, in which expression of the transgene, bov sFRP-1, was repressed by doxycycline treatment when added to the drinking water. During pregnancy, the females were never under doxycycline treatment. The transgene was not repressed during embryonic development, and we did not observe any obvious alteration during embryonic vascular development in double-transgenic embryos (Tie2-tTA/TRE-bov sFRP-1) (Figure 7b).

When we overexpressed bov sFRP-1 transgene all along the kinetics of repair in the Tie2-tTA/TRE-bov sFRP-1 double-transgenic mice, we observed a delay in capillary formation until day 14 after the surgery, ie, 495.5 ± 272.2 capillaries/mm² for Tie2-tTA/TRE-bov sFRP-1 versus 782.1 ± 238.5 for littermates, at day 15, $P < 0.001$. After 14 days, capillary number had further increased in Tie2-tTA/TRE-bov sFRP-1 ischemic muscle. At day 25, capillary density in the Tie2-tTA/TRE-bov sFRP-1 mice ischemic hindlimbs was significantly higher than in those of littermates, ie, 1416 ± 74 capillaries/mm² for Tie2-tTA/TRE-bov sFRP-1 versus 1092 ± 59 for littermates, $P < 0.005$ (Supplementary Figure 4, see <http://ajp.amjpathol.org>).

Because sFRP-1 has been described as being expressed long after muscle ischemia,³⁷ and because it alters cell cycle in vascular cells,¹⁴ we decided to overexpress sFRP-1, not in the precocious phase of muscle repair but 7 days after injury in a model of hindlimb ischemia. In the mouse model of hindlimb ischemia, we showed by qRT-PCR that endogenous sFRP-1 expression was regulated during muscle repair: a strong but late induction of sFRP-1 was observed with a peak at day 7 after injury. At day 14, sFRP-1 expression declined and then returned to near basal level at day 25 (Supplementary Figure 5, see <http://ajp.amjpathol.org>).

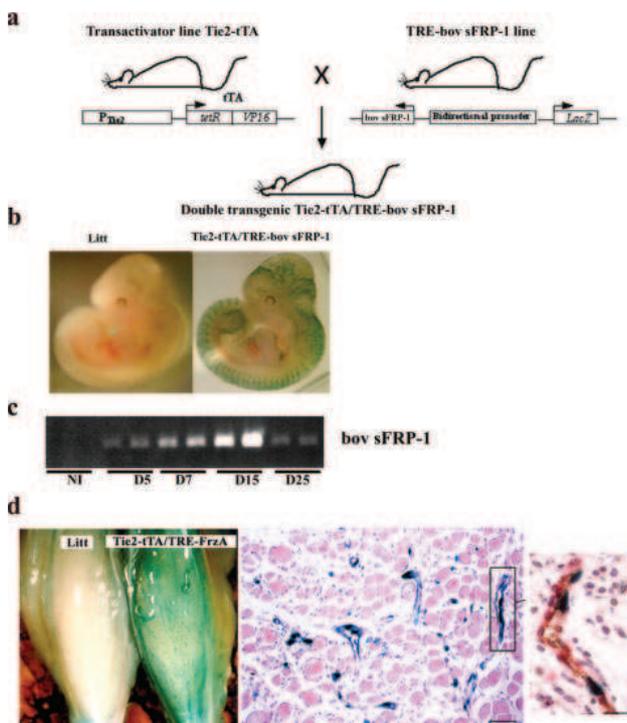


Figure 7. Characterization of the Tie2-tTA/TRE-bov sFRP-1 mice. **a:** Tie2-tTA transactivator mouse line expressing tTA under the control of the endothelial-specific *tie2* promoter was mated with TRE-bov sFRP-1 transgenic mice leading to double-transgenic mice with inducible and endothelium-restricted expression of bovine sFRP-1 and of *LacZ* as reporter gene. **b:** LacZ transgene expression was confined to endothelial cells in Tie2-tTA/TRE-bov sFRP-1 compared to littermate embryo (Litt) at day 11.5 dpc. β -galactosidase expression was evaluated by staining with the chromogenic substrate X-Gal on paraformaldehyde 2% fixed embryos *in toto*. **c:** Expression by RT-PCR of bov sFRP-1 during the kinetics of ischemia. **d:** LacZ transgene expression in Tie2-tTA/TRE-bov sFRP-1 in hindlimb after ischemia: at day 11 after ischemia, X-Gal staining of whole mount hindlimb of Litt and Tie2-tTA/TRE-bov sFRP-1 mice and of thin section displayed strong expression of LacZ in neovessels. Section and **inset** was X-Gal stained for lacZ expression and then double-immunostained with anti-CD31 (in brown) and anti- α -actin (in red) antibodies to localize blood vessel endothelium and pericytes at day 11 in Tie2-tTA/TRE-bov sFRP-1 mice. X-Gal staining demonstrated the selective expression in ECs of neovessels. Scale bar = 50 μ m.

Here, we repressed sFRP-1 expression from day 0 to day 6 after ischemia with doxycycline treatment (OFF). Then doxycycline was withdrawn from the drinking water to allow re-expression of the transgene (ON). The activation of the transgene expression after 7 days of ischemia resulted in a very large increase in capillary density at 15 days in transgenic mice compared to littermates and maintained at day 25, ie, 1318 ± 318 capillaries/mm² for Tie2-tTA/TRE-bov sFRP-1 versus 907 ± 382 capillaries/mm² for littermates, $P < 0.005$ at day 15; and 1406 ± 366 capillaries/mm² for Tie2-tTA/TRE-bov sFRP-1 versus 1141 ± 261 capillaries/mm² for littermates, $P < 0.005$ at day 25 (Figure 8a). This effect on vessel formation was abolished in transgenic animals treated with doxycycline (Figure 8a).

sFRP-1 overexpression induced a dramatic decrease in Ser9 phospho-GSK-3 β levels in double-transgenic hindlimb extracts in comparison to those in littermate extracts at 15 days (Figure 8b). The decrease in phospho-GSK-3 β levels was not found when Tie2-tTA/TRE-bov sFRP-1 mice were treated with doxycycline. Total

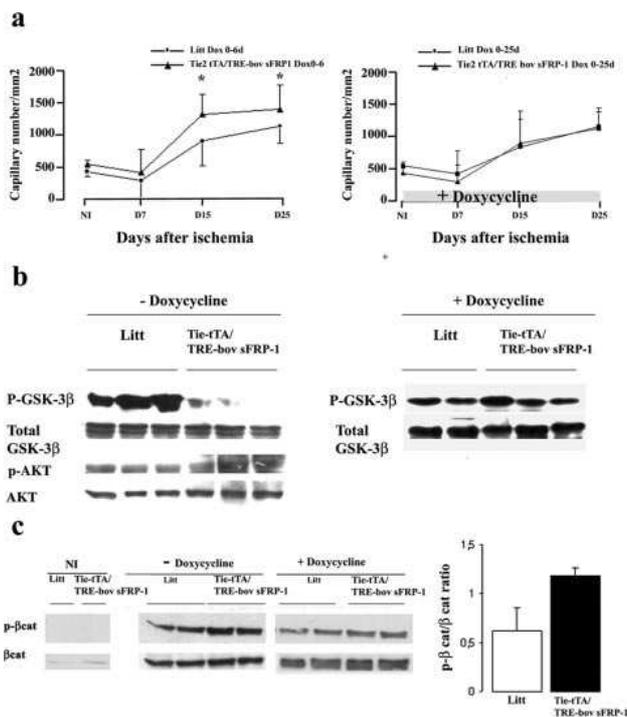


Figure 8. Role of sFRP-1 in neovessel formation and on the level of phosphorylated GSK-3 β and β -catenin after hindlimb ischemia. **a:** Quantitative evaluation of capillary density using CD31 immunostaining (number of vessels/mm²) in tissues retrieved from ischemic anterior tibialis muscle of littermates and Tie2-tTA/TRE-bov sFRP-1 mice treated from day 0 to day 6 with doxycycline (Dox, 0 to 6 days) after ischemia. $*P < 0.001$ and in mice treated with doxycycline after ischemia, from day 0 to day 25 (Dox, 0 to 25 days) after ischemia with doxycycline. $*P < 0.001$. Treatment through the whole period of ischemia with doxycycline in Tie2-tTA/TRE-bov sFRP-1 animals, switched off bovine sFRP-1 expression and restored a kinetics of capillary density similar to that in littermates, thereby confirming the specific role of endothelial bovine sFRP-1 in the modulation of the angiogenic response after ischemia. The levels of either p-GSK-3 β and GSK-3 β total (**b**) or p- β -catenin and total β -catenin (**c**) was compared by Western blot in Tie2-tTA/TRE-bov sFRP-1 versus littermate (Litt) in hindlimb extracts at day 15 after ischemia. Doxycycline was removed from the drinking water 6 days after ischemia, allowing sFRP-1 induction (-doxycycline). Controls were done with mice treated from day 0 to day 15 after injury with doxycycline (+doxycycline). A quantification of the ratio of phospho- β -catenin: β -catenin is presented.

GSK-3 β levels were unchanged before and after ischemia (not shown) and between the two mouse groups at 15 days after ischemia (Figure 8b).

In parallel, we monitored β -catenin and phospho- β -catenin levels in the cytosolic fractions of hindlimb extracts as markers of the canonical Wnt-frizzled pathway. At 15 days after surgery, total cytosolic β -catenin was increased in ischemic hindlimb tissues compared to that in nonischemic tissues. The pattern of total cytosolic β -catenin expression was comparable in Tie2-tTA/TRE-bov sFRP-1 and littermate hindlimb extracts. Phospho- β -catenin was slightly increased in binary transgenic animals at day 15 (Figure 8c). This effect was reversed in double-transgenic animals treated with doxycycline (Figure 8c).

Discussion

It has been recently put forward that the Wnt pathway is involved in vessel formation although its contribution has

been essentially demonstrated through gene inactivation models.^{8,9,10,11} The secreted factor sFRP-1 is able to bind both Wnt proteins and Fzd receptors.⁷ It has been used as a modulator of the Wnt- β -catenin pathway, to study Wnt involvement in vessel biology.³⁸ We have previously demonstrated that *in vitro* sFRP-1 modulated EC angiogenic response (migration, differentiation) and *in vivo* stimulated neovascularization in plug or tumor models.¹⁵ These angiogenic effects seemed independent of the vascular endothelial growth factor pathway. Our present study has unraveled new molecular players in the Wnt/Fzd complex cascade regulating EC behavior during *de novo* vessel formation.

Directed movements of EC during *de novo* vessel formation are coordinated through cellular adhesion mechanisms, cytoskeletal reorganization, and in association with elevated expression of angiogenic factors such as the key factor vascular endothelial growth factor. The regulation of EC cytoskeleton is essential to EC spreading and motility.²⁹ We demonstrate that sFRP-1 had a major role in mediating EC spreading by regulating reorganization of the actin network and focal contact formations. We demonstrated that sFRP-1-induced spreading was extracellular matrix-dependent and involved $\alpha 2\beta 1$ integrin activation. Several publications have recently demonstrated the role of the Wnt/Fzd pathway in cell cytoskeletal remodeling.^{39,40} Interaction between Dishevelled, a common central Wnt mediator, and Rac1 is involved in dendrite morphogenesis through Wnt7b.³⁹ Interference with Dishevelled 2 expression disorganized the actin cytoskeleton in ECs, altering their capacities to form lamellipodia.⁴⁰ Because, the family of the Rho GTPase is important in various aspects of EC cytoskeletal organization, we predicted the participation of Rac1 in sFRP-1-induced spreading. We demonstrated that Rac1 acts downstream of GSK-3 β in the sFRP-1 signaling pathway inducing EC spreading. As Rho GTPase regulated the actin cytoskeleton, our results suggest that sFRP-1, through the activation of GSK-3 β and Rac1, modulates EC organization by regulating the dynamics of actin.

sFRP-1 is a proposed Wnt/Fzd signaling inhibitor, but recent reports showed that sFRP could act through Wnt-independent mechanisms.⁴¹⁻⁴³ In our study, the effect of sFRP-1 on EC spreading is independent of the canonical β -catenin pathway *in vitro* (Figure 2a) but involves GSK-3 β machinery. sFRP-1 has been shown to be able to modulate retinal cell differentiation via the phosphorylation on the Ser9 residue of GSK-3 β .⁴⁴ Moreover, the existence of a noncanonical Wnt pathway involving GSK-3 β has been proposed to regulate cell movement and differentiation, whereas enhanced expression of Wnt2 has been associated with tumoral proinvasive activity and coupled to GSK-3 β inhibition.⁴⁵ However, our results contrast with the study of Kim and colleagues⁴⁶ analyzing the effect of GSK-3 β on EC properties and angiogenesis and reporting inactivation of GSK-3 β as a key regulator of angiogenesis after ischemia. In their study, inactivation of GSK-3 β was induced by phosphorylation via upstream PKB/AKT or protein kinase C activation. In our *in vivo* model or in cultured ECs, the sFRP-1-induced decrease of GSK-3 β phosphorylation state was

independent of any modification of PKB/AKT phosphorylation (Figures 5b and 8b).¹⁵ Although the reason for this discrepancy is unknown, it may indicate differences in GSK-3 β upstream modulation and the influence of Wnt signaling in EC behavior. Based on our observations, we propose that the regulation of GSK-3 β activity via sFRP-1, promotes EC spreading and morphological organization.

It has been recently suggested that sFRP-1 plays the role of a morphogen that could govern the growth of retinal ganglion cell axons. This activity seemed independent of Wnt inhibition but attributable to a direct interaction with an Fzd receptor Fzd2.⁴⁷ We and others³⁰ have reported that ECs were equipped with distinct Frizzled receptors, which led us to evaluate the possible involvement of the Fzd receptors in EC spreading. We demonstrated that sFRP-1 interacted and co-localized with Fzd4 and Fzd7. The functions of some Fzd receptors have recently been explored in mammals. Examination of mice deleted for Fzd4 receptor demonstrated the crucial role of Fzd4 in the migration of ECs along the retinal surface.⁹ Fzd7 has been shown to be involved in neural crest migration.⁴⁸ Using an siRNA-based strategy, inhibition of Fzd4 and Fzd7 expression enhanced EC spreading, inducing large and flattened cells mimicking the EC spreading effect of sFRP-1. It is therefore tempting to speculate that sFRP-1 could act through a dominant-negative mechanism interacting with the Fzd4 and 7 receptors forming nonfunctional complexes.

Our *in vivo* data support a critical role for sFRP-1 in ischemia-induced angiogenesis in adults. We have previously shown that impairment of the canonical Wnt/Fzd pathway in the early phase of ischemia using adenovirus-expressing sFRP-1 reduced vascular cell proliferation and delayed vessel formation.¹⁴ Here, we set up an inducible system to overexpress the sFRP-1 transgene specifically in ECs using a *Tie2* promoter. When sFRP-1 was induced specifically in ECs all along the kinetics of ischemia repair, we obtained a biphasic response: a delay in capillary formation until day 15 and then an increase in vascular formation at day 25. The inducible system allowed a sequential expression of the transgene: ectopic sFRP-1 was repressed until day 6 with doxycycline treatment (OFF) and then induced at day 7 until day 25 by removing doxycycline (ON). Using this strategy, late ectopic expression of sFRP-1 augmented capillary formation and was correlated with GSK-3 β activation. We observed a faint effect of bovine sFRP-1 on phospho- β -catenin level induced by ischemia. The specificity of all of the effects was strengthened by the use of doxycycline as an internal control able to turn off sFRP-1 overexpression after injury.

This inducible transgenic model reveals that sFRP-1 could fine tune the outcome of Wnt/Fzd signaling at different steps in the course of neovessel formation. We propose a model in which sFRP-1 could regulate two processes. In the early angiogenic phases, sFRP-1 could regulate a canonical Wnt/Fzd signaling pathway to alter vascular cell proliferation and recent findings show that its effect is relayed by another pathway that could signal by activating GSK-3 β and participate in neovessel orga-

nization. In conclusion, our study suggests that sFRP-1 might participate in postnatal neovascularization after an ischemic event through a GSK-3 β /Rac1 pathway by blocking Fzd receptor in ECs.

Acknowledgments

We thank Dr. Jeremy Nathans for helpful comments on the manuscript and Dr. E. Dejana for providing β -catenin-deleted EC line, undertaken in the context of The European Vascular Genomics Network.

References

1. Cadigan KM, Nusse R: Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev* 1997, 11:3286–3305
2. Huelsken J, Behrens J: The Wnt signalling pathway. *J Cell Sci* 2002, 115:3977–398
3. Pinson KI, Brennan J, Monkley S, Avery BJ, Skarnes WC: An LD L-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature* 2000, 407:535–538
4. Logan CY, Nusse R: The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004, 20:781–810
5. Kuhl M: The WNT/calcium pathway: biochemical mediators, tools and future requirements. *Front Biosci* 2004, 9:967–974
6. Kawano Y, Kypta R: Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci* 2003, 116:2627–2634
7. Bafico A, Gazit A, Pramila T, Finch PW, Yaniv A, Aaronson SA: Interaction of frizzled related protein (FRP) with Wnt ligands and the frizzled receptor suggests alternative mechanisms for FRP inhibition of Wnt signaling. *J Biol Chem* 1999, 274:16180–16187
8. Ishikawa T, Tamai Y, Zorn AM, Yoshida H, Seldin MF, Nishikawa S, Taketo MM: Mouse Wnt receptor gene Fzd5 is essential for yolk sac and placental angiogenesis. *Development* 2001, 128:25–33
9. Xu Q, Wang Y, Dabdoub A, Smallwood PM, Williams J, Woods C, Kelley MW, Jiang L, Tasman W, Zhang K, Nathans J: Vascular development in the retina and inner ear: control by Norrin and Frizzled-4, a high-affinity ligand-receptor pair. *Cell* 2004, 116:883–895
10. Monkley SJ, Delaney SJ, Pennisi DJ, Christiansen JH, Wainwright BJ: Targeted disruption of the Wnt2 gene results in placental defects. *Development* 1996, 122:3343–3353
11. Shu W, Jiang YQ, Lu MM, Morrisey EE: Wnt7b regulates mesenchymal proliferation and vascular development in the lung. *Development* 2002, 129:4831–4842
12. Blankesteyn WM, van Gijn ME, Essers-Janssen YP, Daemen MJ, Smits JF: Beta-catenin, an inducer of uncontrolled cell proliferation and migration in malignancies, is localized in the cytoplasm of vascular endothelium during neovascularization after myocardial infarction. *Am J Pathol* 2000, 157:877–883
13. Barandon L, Couffignal T, Ezan J, Dufourcq P, Costet P, Alzieu P, Leroux L, Moreau C, Daret D, Duplaa C: Reduction of infarct size and prevention of cardiac rupture in transgenic mice overexpressing FrzA. *Circulation* 2003, 108:2282–2289
14. Ezan J, Leroux L, Barandon L, Dufourcq P, Jaspard B, Moreau C, Allieres C, Daret D, Couffignal T, Duplaa C: FrzA/sFRP-1, a secreted antagonist of the Wnt-Frizzled pathway, controls vascular cell proliferation in vitro and in vivo. *Cardiovasc Res* 2004, 63:731–738
15. Dufourcq P, Couffignal T, Ezan J, Barandon L, Moreau M, Daret D, Duplaa C: FrzA, a secreted Frizzled related protein, induced angiogenic response. *Circulation* 2002, 106:3097–3103
16. Arbiser JL, Moses MA, Fernandez CA, Ghiso N, Cao Y, Klauber N, Frank D, Brownlee M, Flynn E, Parangi S, Byers HR, Folkman J: Oncogenic H-ras stimulates tumor angiogenesis by two distinct pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, 94:861–866
17. Davis W, Stephens LR, Hawkins PT, Saklatvala J: Synergistic activation of JNK/SAPK by interleukin-1 and platelet-derived growth factor is independent of Rac and Cdc42. *Biochem J* 1999, 338:387–392
18. Duplaa C, Jaspard B, Moreau C, D'Amore PA: Identification and cloning of a secreted protein related to the cysteine-rich domain of frizzled. Evidence for a role in endothelial cell growth control. *Circ Res* 1999, 84:1433–1445
19. Jaspard B, Couffignal T, Dufourcq P, Moreau C, Duplaa C: Expression pattern of mouse sFRP-1 and mWnt-8 gene during heart morphogenesis. *Mech Dev* 2000, 90:263–267
20. Dufourcq P, Couffignal T, Alzieu P, Daret D, Duplaa C, Bonnet J: Vitronectin is up regulated after vascular injury and vitronectin blockade prevents neointima formation. *Cardiovasc Res* 2002, 53:952–962
21. Coghlan MP, Culbert AA, Cross DA, Corcoran SL, Yates JW, Pearce NJ, Rausch OL, Murphy GJ, Carter PS, Roxbee Cox L, Mills D, Brown MJ, Haigh D, Ward RW, Smith DG, Murray KJ, Reith AD, Holder JC: Selective small molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 modulate glycogen metabolism and gene transcription. *Chem Biol* 2000, 7:793–803
22. Summers SA, Kao AW, Kohn AD, Backus GS, Roth RA, Pessin JE, Birnbaum MJ: The role of glycogen synthase kinase 3beta in insulin-stimulated glucose metabolism. *J Biol Chem* 1999, 274:17934–17940
23. Kalman D, Gomperts SN, Hardy S, Kitamura M, Bishop JM: Ras family GTPases control growth of astrocyte processes. *Mol Biol Cell* 1999, 10:1665–1683
24. Chartier C, Degryse E, Gantzer M, Dieterle A, Pavirani A, Mehtali M: Efficient generation of recombinant adenovirus vectors by homologous recombination in *Escherichia coli*. *J Virol* 1996, 70:4805–4810
25. Barandon L, Dufourcq P, Costet P, Moreau C, Allieres C, Daret D, Dos Santos P, Daniel Lamaziere JM, Couffignal T, Duplaa C: Involvement of FrzA/sFRP-1 and the Wnt/frizzled pathway in ischemic preconditioning. *Circ Res* 2005, 96:1299–1306
26. Donze O, Picard D: RNA interference in mammalian cells using siRNAs synthesized with T7 RNA polymerase. *Nucleic Acids Res* 2002, 30:e46
27. Couffignal T, Kearney M, Sullivan A, Silver M, Tsurumi Y, Isner JM: Histochemical staining following Lac-Z gene transfer underestimates transfection efficiency. *Hum Gene Ther* 1997, 8:929–934
28. Bendeck MP, Conte M, Zhang M, Nili N, Strauss BH, Farwell SM: Doxycycline modulates smooth muscle cell growth, migration, and matrix remodeling after arterial injury. *Am J Pathol* 2002, 160:1089–1095
29. Huttenlocher A, Sandborg RR, Horwitz AF: Adhesion in cell migration. *Curr Opin Cell Biol* 1995, 7:697–706
30. Masckauchan TN, Shawber CJ, Funahashi Y, Li CM, Kitajewski J: Wnt/beta-catenin signaling induces proliferation, survival and interleukin-8 in human endothelial cells. *Angiogenesis* 2005, 8:43–51
31. Nobes CD, Hall A: Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 1995, 81:53–62
32. Price LS, Leng J, Schwartz MA, Bokoch GM: Activation of Rac and Cdc42 by integrins mediates cell spreading. *Mol Cell Biol* 1998, 9:1863–1871
33. Cattelino A, Liebner S, Gallini R, Zanetti A, Balconi G, Corsi A, Bianco P, Wolburg H, Moore R, Oreda B, Kemler R, Dejana E: The conditional inactivation of the beta-catenin gene in endothelial cells causes a defective vascular pattern and increased vascular fragility. *J Cell Biol* 2003, 162:1111–1122
34. Barandon L, Couffignal T, Dufourcq P, Alzieu P, Moreau C, Daret D, Duplaa C: Exact relevance of bone marrow cells in the healing process after myocardial infarction: analysis with a murine model of bone marrow cell transplantation. *Can J Cardiol* 2005, 21:563–568
35. Hangai M, Moon YS, Kitaya N, Chan CK, Wu DY, Peters KG, Ryan SJ, Hinton DR: Systemically expressed soluble Tie2 inhibits intraocular neovascularization. *Hum Gene Ther* 2001, 12:1311–1321
36. Voskas D, Jones N, Van Slyke P, Sturk C, Chang W, Haninec A, Babichev YO, Tran J, Master Z, Chen S, Ward N, Cruz M, Jones J, Kerbel RS, Jothy S, Dagnino L, Arbiser J, Klement G, Dumont DJ: A cyclosporine-sensitive psoriasis-like disease produced in Tie2 transgenic mice. *Am J Pathol* 2005, 166:843–855
37. Poleskaya A, Seale P, Rudnicki MA: Wnt signaling induces the myogenic specification of resident CD45+ adult stem cells during muscle regeneration. *Cell* 2003, 113:841–852
38. Dennis S, Aikawa M, Szeto W, d'Amore PA, Papkoff J: A secreted frizzled related protein, FrzA, selectively associates with Wnt-1 protein and regulates wnt-1 signaling. *J Cell Sci* 1999, 112:3815–3820
39. Rosso SB, Sussman D, Wynshaw-Boris A, Salinas PC: Wnt signaling through Dishevelled. Rac and JNK regulates dendritic development. *Nat Neurosci* 2005, 8:34–42
40. Wechezak AR, Coan DE: Dvl2 silencing in postdevelopmental cells

- results in aberrant cell membrane activity and actin disorganization. *J Cell Physiol* 2005, 202:867–873
41. Collavin L, Kirschner MW: The secreted Frizzled-related protein Sizled functions as a negative feedback regulator of extreme ventral mesoderm. *Development* 2003, 130:805–816
 42. Yabe T, Shimizu T, Muraoka O, Bae YK, Hirata T, Nojima H, Kawakami A, Hirano T, Hibi M: Ogon/Secreted Frizzled functions as a negative feedback regulator of Bmp signaling. *Development* 2003, 130:2705–2716
 43. Lee JL, Lin CT, Chueh LL, Chang CJ: Autocrine/paracrine secreted Frizzled-related protein 2 induces cellular resistance to apoptosis: a possible mechanism of mammary tumorigenesis. *J Biol Chem* 2004, 279:14602–14609
 44. Esteve P, Trousse F, Rodriguez J, Bovolenta P: SFRP1 modulates retina cell differentiation through a beta-catenin-independent mechanism. *J Cell Sci* 2003, 116:2471–2481
 45. Le Floch N, Rivat C, De Wever O, Bruyneel E, Mareel M, Dale T, Gespach C: The proinvasive activity of Wnt-2 is mediated through a noncanonical Wnt pathway coupled to GSK-3beta and c-Jun/AP-1 signaling. *FASEB J* 2005, 19:144–146
 46. Kim HS, Skurk C, Thomas SR, Bialik A, Suhara T, Kureishi Y, Birnbaum M, Keaney Jr JF, Walsh K: Regulation of angiogenesis by glycogen synthase kinase-3beta. *J Biol Chem* 2002, 277:41888–41896
 47. Rodriguez J, Esteve P, Weinl C, Ruiz JM, Fermin Y, Trousse F, Dwivedy A, Holt C, Bovolenta P: SFRP1 regulates the growth of retinal ganglion cell axons through the Fz2 receptor. *Nat Neurosci* 2005, 8:1301–1309
 48. De Calisto J, Araya C, Marchant L, Riaz CF, Mayor R: Essential role of non-canonical Wnt signalling in neural crest migration. *Development* 2005, 132:2587–2597

II. Implication de Fzd4 dans la formation des vaisseaux

A. Matériels et méthodes

1. Analyses *in vivo*

a) Génotypage des souris WT et KO

Les souris délétées du gène *fzd4* (*fzd4*^{-/-}) proviennent de l'équipe de Nathans. J (Baltimore, USA). Elles sont élevées sous un fond hybride (CBA, C57BL6J) et ont une couleur gris-taupe caractéristique.

Pour génotyper les souris, l'ADN d'un échantillon de tissus provenant de l'animal, comme l'extrémité distale de la queue de souris, est extrait dans une solution contenant 1 µl de protéinase K dans 50 µl de tampon de lyse (DirectPCR, Viagen), à 56°C pendant 16 h. La protéinase K est ensuite inactivée en chauffant l'échantillon pendant 45 min à 85°C. Après centrifugation, le surnageant contenant l'ADN extrait est soumis à une réaction de polymérase en chaîne (PCR) afin de génotyper les souris suivant le protocole décrit par Hsieh et al. (Hsieh et al. 2005).

Les amorces utilisées sont répertoriées dans le **Tableau 6**.

Gène	Sens	Séquence 5' → 3'
	Antisens	3' ← 5'
<i>mFz4</i> <i>endogène</i>	F	TGGAAAGGCTAA TGGTCAAGATCGG
	B	TTCTGATGCTGAGTTGGGTGAGTGG
<i>mFz4</i> <i>exogène</i>	F	CATCAACATTAATGTGAGCGAGT
	B	TGTCTGCTAGATCAGCCTCTGCCG

Tableau 6: Amorces de PCR

b) Analyse immunohistochimique

(1) Marquage Xgal sur tissus

Chez les souris *fzd4*^{-/-}, la délétion du gène *fzd4* a été substituée par l'insertion du gène *lacZ*. Ainsi, le gène de la β -galactosidase est sous le promoteur du gène *fzd4*, nous permettant ainsi d'étudier le profil d'expression vasculaire de *fzd4* sur les souris *fzd4*^{+/-}.

Pour cela, le tissu d'intérêt est tout d'abord prélevé et fixé au paraformaldéhyde (PFA) 2%, pendant 10 min. Une fois rincé au PBS1X, il est incubé avec une solution de révélation Xgal

(Euromedex) à 37°C, pendant plusieurs heures, variables suivant la grosseur de l'organe. Une post fixation est ensuite réalisée au PFA 4% pendant 1 h afin de conserver la coloration Xgal. Après lavages, l'organe est déshydraté dans plusieurs bains d'alcool (éthanol 50%, 80%, 95% et 100%, et xylène) puis est inclus dans la paraffine.

Chaque bloc de paraffine est ensuite coupé à l'aide d'un microtome, en coupes de 10 µm. Celles-ci sont déposées sur lames et mises à sécher à 37°C. Le lendemain, les coupes sont déparaffinées à l'aide à nouveau de différents bains d'alcool (xylène, éthanol 100%, 95% et 80%). Une fois rincées à l'eau distillée, les coupes sont colorées au rouge nucléaire Kernechtrot (Sigma) pendant 1 min. Après 3 lavages rapides à l'eau distillée, les coupes sont déshydratées (éthanol absolu puis xylène). Enfin, les lames sont montées sur lamelle dans du milieu de montage Eukitt (Kindler) et sont analysées au microscope droit Nikon (MICROPHOT-FXA).

(2) Marquage des érythrocytes

L'analyse de la perfusion sanguine a été réalisée par un marquage des érythrocytes sur des coupes de cœurs et de reins inclus dans des blocs de paraffine. La préparation des coupes d'organes s'est effectuée suivant le protocole décrit précédemment. Ensuite, après saturation dans une solution de BSA 1%/Triton X100 0.1%, pendant 10 min, les coupes sont incubées avec l'anticorps anti-TER119 (**Tableau 7**). Après lavages au PBS1X, les lames sont mises en présence de l'anticorps secondaire correspondant (**Tableau 7**), pendant 4h à température ambiante. L'IgG secondaire couplé à la peroxydase est ensuite révélé par un marquage diaminobenzidine (DAB, Ventana) pendant 1 min. Une fois lavées, les lames sont montées sur lamelle dans le milieu de montage Eukitt (Kindler) et observées au microscope droit Nikon (MICROPHOT-FXA), à l'aide d'une caméra couleur (Nikon Digital camera DXM1200F).

La quantification du marquage des érythrocytes sur le cœur et les reins a été réalisée suivant la méthode décrite par J.M. Daniel Lamazière (Lamaziere et al. 1993), analysant la quantité de coloration TER119 (en unité arbitraire (UA)) en fonction de la surface du tissu analysé (UA/mm²).

(3) Marquage sur coupes in toto

Pour le marquage des organes *in toto*, les organes prélevés sont tout d'abord fixés au PFA 2% pendant 30 min. Ils sont ensuite coupés à l'aide d'un vibratome en plusieurs tranches épaisses de 100 à 200 µm, sont rincées au PBS1X et placées dans un microtube dans lequel le marquage est réalisé. Le marquage CD31 nécessite un démasquage des sites par traitement à

la protéinase K (20 µg/ml, Sigma) pendant 30 min à 37°C. Les coupes sont alors saturées dans une solution de BSA 1%/Triton X100 0.1%, pendant 10 min. Les coupes sont ensuite incubées avec les anticorps anti-CD31 et anti-αSMA en même temps, toute la nuit (**Tableau 7**). Après lavages au PBS1X, les lames sont mises en présence des anticorps secondaires correspondant (**Tableau 7**), pendant 4h à température ambiante. Une fois lavées, les lames sont montées sur lamelle dans le milieu de montage Eukitt (Kindler) et observées au microscope confocal Olympus (IX81).

Le marquage *in toto* du CD31 et de l'αSMA révèle respectivement les CE et les CML, et donc le réseau vasculaire. Les images prises au confocale sur toute l'épaisseur de la coupe sont déconvoluées à l'aide du logiciel autoQuant deconvolution (Mediacybernetics). Afin de visualiser en 3D l'organisation du réseau vasculaire sur tranche épaisse et de quantifier la densité de CD31 et d'αSMA par unité de volume du tissu analysé, les images ont aussi été reconstruites dans le logiciel Imaris Software (Bitplane).

Antigènes	Types/hôte	Référence/ Provenance	Dilution	AC secondaire	Dilution
CD31	Monoclonal/ Rat	T-2001 / BMA	1/100 ^{ème}	IgG rat – Alexa 568nm	1/400 ^{ème}
αSMA	Monoclonal/ Souris	A 2547 / Sigma	1/400 ^{ème}	IgG souris - FITC	1/100 ^{ème}
TER 119	Monoclonal/ Souris	550565/ Pharmingen	1/1000 ^{ème}	IgG souris - péroxydase	1/1000 ^{ème}

Tableau 7 : Liste des anticorps utilisés en immunofluorescence sur coupes *in toto*

c) Analyse du réseau artériel par microscanner

Le microscanner permet d'appréhender l'organisation tridimensionnelle des vaisseaux. Dans cette étude, il a permis l'analyse et la comparaison du réseau artériel de différents organes entre les souris *fzd4^{+/+}* et *fzd4^{-/-}* (Oses et al. 2009). Cette analyse au microCT a été réalisée par plusieurs étudiants : Pierre Oses, Rémi Chauvel et Benjamin Seguy.

(1) Préparation du produit de contraste et injection de l'animal

Le produit de contraste

Le produit de contraste (pdc) radio-opaque mis au point au laboratoire est un mélange de latex Néoprène 80% (Latex Néoprène Dispersion 671 A©), de sulfate de baryum (Micropaque® solution buvable) à une concentration de 220 g/l (meilleur compromis entre contraste et pénétrance du mélange dans les petits vaisseaux) et d'un colorant neutre bleu-hélio à haute concentration.

Dans le but de faciliter la progression du pdc, les souris reçoivent au préalable une injection intrapéritonéale d'anticoagulants (Héparine 25 000 UI/l) et d'antiagrégants (Kardégic 160 mg/l), 1 h avant l'injection du pdc.

Méthode d'injection

Après euthanasie et ouverture de la cage thoracique de l'animal, le tronc de l'artère brachio-céphalique (TABC) jusqu'à l'arche aortique est libéré sous loupe binoculaire. Il est ainsi ouvert ponctuellement à l'aide d'une aiguille creuse 30 G où un lavage du réseau vasculaire de la souris est réalisé avec un liquide isotonique hépariné à 25 000 UI/l. Lorsque le liquide de rinçage devient clair, on réalise une préfixation des tissus par l'écoulement de PFA 1% pendant 1 min. Le pdc est alors progressivement injecté sous 1 mètre d'eau de pression. L'animal est placé en milieu acide jusqu'à polymérisation du pdc. Enfin, on réalise une dissection soignée des organes à examiner : le cœur, les deux reins et les muscles des pattes. Les tissus sont ensuite fixés dans le PFA 4% pendant 16 h, puis conservés dans le PBS1X à 4°C.

(2) Acquisition et analyse des images

L'imagerie des vaisseaux a été réalisée avec le micro-scanner eXplore Locus Micro-CT de Général Electric Healthcare®, ayant une résolution spatiale de 36 à 7 µm, et les logiciels Scan control® et Reconstruction utility®.

Acquisition des images

L'acquisition des images se fait dans un tube en plastique fixé sur un support de rotation. Une puissance réglée à 80 mV et 60 mA permet d'obtenir un bon compromis à la fois dans l'exposition et dans la pénétrance des rayons au travers des tissus. 360 images sont ainsi obtenues (une par degré de rotation). La résolution choisie est de 16 µm (le facteur limitant étant la puissance des ordinateurs). Ainsi paramétrée, l'acquisition dure environ 1 heure et 10 minutes. Les images sont ensuite reconstruites à l'aide du logiciel de reconstruction en 3 dimensions, Reconstruction utility®.

Analyse et quantification

Une fois reconstruites, les images sont analysées par un logiciel d'analyse et de quantification, Microview®. Pour cela, certains paramètres doivent être déterminés. Tout d'abord, un seuil est choisi, et correspond au seuil le plus bas pour lequel aucun bruit (voxel blanc hors d'une structure vasculaire) n'est visible à résolution maximale. Il est aussi nécessaire de déterminer des critères d'exclusion: un rapport signal sur bruit trop faible est à exclure pour permettre une analyse fiable, ou une mauvaise injection des vaisseaux par le latex baryté (diamètre des plus petits vaisseaux injectés >20µm).

Enfin, avec les outils de quantification Bone Analysis® et Advanced Bone Analysis®, des données telles que le nombre de branchements total et la densité vasculaire moyenne sont calculées.

d) Analyse des paramètres cardiaques, rénaux et vasculaires

Paramètres cardiaques

Les souris sont endormies par une injection intrapéritonéale d'un produit anesthésiant (Imalgène et Rompun) et placées sous une lampe chauffante pour éviter toute hypothermie. Après ouverture de la cage thoracique de l'animal, la carotide droite est cathétérisée par une sonde d'enregistrement de pression (Millar®) de 1.4 Fr. Le cathéter est descendu dans le ventricule gauche et les paramètres suivants sont enregistrés à l'aide d'un amplificateur EMK et du logiciel IOX (EMKA): la constante de relaxation Tau et les indices de contraction $dP/dt(+)$ et de relaxation $dP/dt(-)$. Ces paramètres sont enregistrés après une phase de stabilisation sans et avec perfusion de dobutamine (60 µg intrapéritonéale).

Paramètres rénaux

Les paramètres rénaux des souris $fzd4^{-/-}$ et $fzd4^{+/+}$ ont été analysés par le Dr Dominique ELADARI, Unité INSERM 872, Paris. La clearance des créatinines, le taux de rénine plasmatique, le taux d'excrétion de l'aldostérone, et les données brutes de sang et de plasma (pCO_2 , pO_2 , le taux de Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^- ,...) ont été mesurés. Toutes les expériences ont été réalisées sur des souris âgées de 3 à 5 mois.

Paramètres vasculaires

Différents paramètres vasculaires sur différents types d'artères ont été analysés lors de cette étude. Le Dr Patrick Lacolley (UHP-INSERM U684, Nancy) a réalisé une analyse

morphométrique et mécanique d'une artère de gros calibre, la carotide, provenant des souris *fzd4^{-/-}* et sauvages. Plusieurs paramètres morphométriques de la paroi carotidienne tels que le pourcentage en élastine et en collagène, le nombre de CML, l'épaisseur, la section médiale et le diamètre du vaisseau ont été mesurés. Les paramètres mécaniques mesurant la compliance, la distensibilité et le module d'élasticité de l'artère à pression moyenne ont été également analysés.

Le Dr Daniel Henrion (UMR CNRS 6214 - INSERM 771, Angers) a réalisé une analyse de la réactivité d'artères moyennes cérébrales et mésentériques de souris *fzd4^{-/-}* et sauvages. La contraction des artères au chlorure de potassium (KCl), à la sérotonine (5HT, 10^{-7} M), à la phényléphrine (PE, 10^{-6} M) et la dilatation à l'acétylcholine (Ach, 10^{-6} M) ont été mesurées. De plus, le tonus myogénique et le diamètre passif ont été analysés sous l'effet de la pression (0-125 mmHg), ainsi que la dilatation des artères sous l'effet du flux (0-100 $\mu\text{m}/\text{min}$).

e) Analyse génomique par MicroArray

L'extraction des ARNm et l'analyse génomique par microarray des cœurs de nouveaux-nés (P4) *fzd4^{+/+}* et *fzd4^{-/-}* ont été réalisées par l'équipe de A.J. Horrevoets (Hollande) selon le protocole suivant :

Douze cœurs de souris nouveaux-nés (P4) ont été broyés dans du réactif Trizol (Invitrogen, #15596-018) pendant 30 sec à l'aide d'un broyeur/mélangeur (PT1200, Polytron, Suisse). Les ARN totaux ont ensuite été extraits par une méthode phénol/chloroforme (Ambion, Austin, Texas, USA), comme il sera détaillé dans la partie « Détection des ARNm ». Puis, ces ARN sont purifiés et concentrés à l'aide d'une colonne de lavage (RNeasy Micro, Qiagen, Venlo, Hollande).

Les molécules d'ARNm obtenus ont ensuite été amplifiées linéairement et biotinylées par l'utilisation d'un kit d'amplification (Illumina TotalPrep RNA amplification kit, Ambion, Austin, Texas). Après un contrôle de qualité par un bioanalyseur (BioAnalyzer), les 12 échantillons ont été hybridés, sur des positions aléatoires, avec des billes Sentrix MouseRef-6v2 Expression bead chips (Illumina, San Diego, CA). Ces hybridations, après scan et extraction par Illumina's BeadStudio software, ont été suivies par ServiceXS (Leiden, the Netherlands).

Une normalisation quantile a été appliquée sur les données d'intensité relevées par le microarray sur les 15877 sondes. Des comparaisons statistiques entre les transcriptomes des cœurs *fzd4KO* et sauvages ont été faites avec un test Cyber-T (Long et al. 19937-44) et un test de correction Benjamini / Hochberg FDR correction (Reiner, Yekutieli, and Benjamini 368-

75). Une analyse GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) a aussi été réalisée sur ces cœurs en utilisant la base de données MSigDB 2 (TRANSFAC 7.4) et la base de données Gene ontology.

2. Analyses in vitro

a) Culture cellulaire

(1) Isolement de cellules primaires

(a) Isolement de cellules endothéliales primaires à partir de reins de souris

Après avoir sacrifié 8 souris, les reins sont prélevés dans du PBS1X contenant du CaCl₂ et du MgCl₂ (PBS Ca/Mg, Gibco). Une fois coupés en morceaux très fins, ils sont mis à incuber sous agitation pendant 45 min à 37°C dans une solution de PBS Ca/Mg contenant de la collagénase de type I (2 mg/ml, Sigma). La suspension est ensuite triturée avec une canule, filtrée en premier avec un filtre de 70 µm (BD), puis avec un filtre de 30 µm (Miltenyi). Après centrifugation et plusieurs lavages au PBS Ca/Mg, les cellules sontensemencées dans des petites boîtes de pétri (35x10 mm), dans le milieu MEM supplémenté de D-valine. Cinq jours plus tard, les cellules, trypsinées (0.05% trypsine-EDTA, Gibco), sont incubées avec deux AC différents : 12.5 µg/ml d'anticorps anti-CD31 (PharMingen) et 5 µg/ml d'anticorps anti-endoglin (Santacruz), pendant 30 min à température ambiante. Puis la suspension cellulaire est mise en présence de microbilles couplées à des IgG de rat (Miltenyi) pendant 15 min à 4°C. Après plusieurs lavages au PBS Ca/Mg, la suspension cellulaire est séparée après passage sur une colonne magnétique (MS MACS columns, Miltenyi) selon le protocole décrit. Les cellules endothéliales isolées contenues dans l'éluât sont alorsensemencées dans des puits de 4 cm², dans le milieu de culture EBM-2. Les cellules sont directement utilisées et la pureté de séparation des CE est vérifiée par un marquage immunohistochimique avec un AC anti-CD31.

(b) Isolement de cellules musculaires lisses primaires à partir d'aortes de souris

Après avoir sacrifié 8 souris, les aortes sont prélevées dans du PBS Ca/Mg, et directement incubées sous agitation pendant 30 min à 37°C dans une solution PBS Ca/Mg contenant de la collagénase de type 4 (1 mg/ml, Sigma) et de l'élastase (125 µg/ml, Sigma). Les aortes sont ensuite dénudées de leur adventice sous la loupe, et une fois coupées en morceaux très fins, sont mises à incuber à nouveau dans la solution de collagénase/élastase pendant 2h, à 37°C, sous agitation et en triturant la solution de temps en temps. La suspension cellulaire est

ensuite lavée au PBS Ca/Mg, centrifugée, et les cellules sont ensemencées dans deux puits de 4 cm², dans leur milieu de culture. Les cellules sont utilisées jusqu'au 7^{ème} passage et la pureté de préparation des CML est vérifiée par un marquage immunohistochimique avec les anticorps anti- α -SMA (α -Smooth muscle Actin) et anti-smMHC (smooth muscle Myosin Heavy Chain).

(c) Isolement de MEF (Murine Embryonic Fibroblasts)

Les MEF (Murin embryonic fibroblast) sont isolés à partir d'embryons de souris au stade embryonnaire 13.5 jours après coïtum. Après avoir enlevé la tête et les organes, les embryons sont rincés dans du PBS1X, coupés en morceaux très fins et digérés dans une solution de trypsine à 0.05% (Gibco) contenant 25 μ g/ml de DNase. La digestion des tissus s'effectue pendant 3 fois 30 min, à 37°C sous agitation, où l'on ajoute à chaque fois 1 ml de solution de trypsine-DNase fraîche. La réaction enzymatique de la trypsine est ensuite stoppée par l'ajout de 2 ml de SVF. La suspension cellulaire est alors centrifugée et filtrée, et les cellules sont mises en adhésion dans des boîtes de pétri (100x20 mm) dans du milieu MEF. Les cellules sont utilisées jusqu'au 6^{ème} passage.

(2) Mise en culture des cellules

Lignées cellulaires

Les cellules endothéliales humaines de la lignée HMEC-1 (Human Microvascular Endothelial Cells) sont cultivées dans un milieu complet Endothelial cell basal medium (EBM complété de facteurs de croissance (EGM-MV) de chez Clonetics, sur puits recouverts de 2% de gélatine. Les fibroblastes embryonnaires de souris 3T3 et les cellules épithéliales embryonnaires de reins humaines 293TG sont cultivés dans du milieu DMEM à 4.5g/l de glucose supplémenté de 10% de SVF.

Cellules primaires

Les cellules endothéliales primaires isolées à partir de reins murins sont cultivées dans 2 milieux différents, suivant l'étape de la purification. Dans un premier temps, elles sont ensemencées sur des puits recouverts de 0.2% de gélatine, dans un milieu MEM supplémenté de 100 μ g/ml d'héparine, de 50 μ g/ml d'ECGF (Endothelial Cell Growth Factor), de 3.5 g/l de glucose, de 50 mg/ml de D-valine, et de 20% de sérum de veau foetal (SVF) (Hyclone). Après purification sur billes magnétiques, ces cellules endothéliales sont cultivées dans un milieu complet Endothelial cell basal medium (EBM2) complété de facteurs de croissance (EGM2) de chez Clonetics, sur puits recouverts de 5 μ g/ml de fibronectine. Les cellules musculaires lisses primaires isolées à partir d'aortes de souris sont cultivées dans un milieu

DMEM complété avec 20% de SVF, 1% d'acides aminés non essentiels et 1% de L-glutamine, sur des puits recouverts de 0.2% de gélatine. Les fibroblastes isolées à partir des embryons murins (MEF) sontensemencés sur des puits recouverts de 0.1% de gélatine, dans du milieu DMEM supplémenté de 10% de SVF (Hyclone).

Toutes les cellules sont cultivées à 37°C dans un incubateur avec 5% CO₂ / 95% air. Dans tous les milieux sont ajoutés de la pénicilline (50 U/ml), de la streptomycine (50 µg/ml) et de l'Hepes (25 mM).

Les cellules sontensemencées dans des puits à une certaine densité cellulaire, spécifique du type de cellule (**Tableau 8**).

Type cellulaire	Densité cellulaire (Nbre de cellules / cm ²)	Milieu de privation
HMEC-1	20 000	DMEM 1%SVF/0.25%BSA
3T3	20 000	DMEM 0%
293TG	50 000	DMEM 0%
CE rénales primaires	50 000	DMEM 1%SVF/0.25%BSA
CML aortiques primaires	30 000	DMEM 1%SVF/0.25%BSA
MEF	25 000	DMEM 0%

Tableau 8: Les différentes densités cellulaires pour la transfection des cellules

Les privations de sérum durent entre 12 h et 24 h suivant le type de cellules et les conditions d'expérience, dans un milieu de privation approprié (**Tableau 7**).

(3) *Transfection des cellules*

Les cellules sontensemencées et incubées toute la nuit pour permettre l'adhésion cellulaire dans leurs milieux respectifs. Les agents de transfection Lipofectamine (Invitrogen) pour la transfection de plasmides et Interferin (Polyplus) pour la transfection de siRNA ont été utilisés.

Transfection de plasmides

Pour une transfection de 1.5 µg/ml de plasmide, les cellules sont incubées pendant 4 h avec une solution de transfection (500 µl pour un puits de 4 cm²) composée de 2.25 µl de réactif, 1.5 µl de Lipofectamine, 1.5 µg/ml de plasmide (0.75 µg/ml chacun si il y a 2 plasmides) et 500 µl de milieu de transfection optiMEM (Gibco). Les cellules sont ensuite lavées et mises

dans leur milieu de culture. Suivant le type d'expérience, nous attendons 24 h ou 48 h après la transfection pour arrêter la manipulation.

Nous avons utilisé différentes constructions répertoriées dans le **tableau 9**, qui ont été réalisées au laboratoire ou qui proviennent d'autres équipes.

Plasmide	Abréviation	Etiquette	Correspondance	Origine
pmaxFP-mDvl1-Green N Final	Dvl1G	Green	Dvl1	Laboratoire
pmax FP-mDvl2-Green N Final	Dvl2G	Green	Dvl2	Laboratoire
pmaxFP-mDvl3-Green N Final	Dvl3G	Green	Dvl3	Laboratoire
pmaxFP-mDvl3- Δ DIX -Green N Final	Dvl3 Δ DIXG	Green	Dvl3 délété du domaine DIX	Laboratoire
pFzd4-HA	Fzd4	HA	Fzd4	(Yu et al. 2007)
pCRD Fzd4 myc GPI (1-181 aa)	Fzd4CRD	myc	Fzd4 ne contenant que son domaine CRD	(Hsieh et al. 1999)
pmFzd7	Fzd7	-	Fzd7	Aaronson laboratory, NY
pmaxFP-Green	pmaxG	Green	Vecteur vide	Amxa
Super 8X TOP/Flash	TOP	Rapporteur Luciferase	8 sites de fixation pour la β -caténine	Randal T. Moon laboratory
Renilla Luciferase	Renilla	-	Renilla Luciferase	Promega

Tableau 9: Les différentes constructions utilisées pour les expériences

Transfection de siRNA

Pour un puits de 4 cm², les cellules sont incubées, pendant 4 h, avec une solution contenant 4 μ l d'Interferin, 30 nM de siRNA et 100 μ l d'optiMEM (Gibco) dans un volume final de 600 μ l de milieu de culture qsp. Les cellules sont ensuite lavées et mises dans leur milieu de culture. Il faut attendre 48 h après la transfection pour obtenir le maximum d'efficacité des

siRNA, avant d'arrêter l'expérience. Ce taux d'extinction est vérifié par analyse transcriptionnelle (voir partie «Mise au point des outils»). Le siRNA contrôle (SR-CL000-005) et les siRNA dirigés contre *fzd4* proviennent de chez Eurogentec. La séquence des siRNA dirigés contre *fzd4* a été obtenue chez Qiagen (hfzd4) ou Ambion (mfzd4): pour hfzd4: 5'- GAA UGA UAG UGC CUU UAA Att -3' (#SI02639105); pour mfzd4: 5'- GGA UGU GCA AUA AUU UUC Utt -3' (#61777).

(4) Traitement des cellules

Pour les expériences de Western blot, nous avons activé les cellules avec différents facteurs de croissance afin d'étudier leurs effets sur la réponse intracellulaire. Après déprivation, les cellules ont été traitées avec 20 ng/ml des facteurs de croissance suivants : du Fibroblast Growth factor basic human (bFGF, Sigma) et du Platelet-derived growth factor BB human (PDGF-BB, Sigma) pendant 30 min, et du Transforming growth factor β 1 human (TGF- β 1, Sigma) pendant 15 min.

Pour les expériences de migration, 20 ng/ml de bFGF et 40 ng/ml de protéine recombinante purifiée Vascular endothelial growth factor A (VEGFA, R&D Systems) ont été utilisés.

b) Tests fonctionnels

(1) Prolifération cellulaire

(a) Comptage cellulaire

Après ensemencement dans des puits de 2 cm², les cellules sont soit transfectées avec les siRNA, soit simplement cultivées dans leur milieu de culture. De là, un comptage cellulaire de chaque puits est réalisé à différents temps. Pour cela, les cellules sont d'abord lavées deux fois dans du PBS1X, puis trypsinées pour être ensuite comptées à la cellule de Neubauer. Pour chaque condition, 3 puits sont comptés.

(b) Incorporation du BrdU dans les cellules

Les cellules sont ensemencées dans des puits de Labtek à 8 compartiments (Labtek-II system, Nalge Nunc International Corp.). A 70% de confluence, elles sont incubées dans une solution de BrdU (BromodéoxyUridine, Sigma) à 10 μ M pendant 30 min, avant d'être fixée dans de l'éthanol 70%. Elles sont ensuite traitées pendant 30 min avec une solution de HCl 2N pour faciliter l'accès à l'anticorps, puis 2x10 min avec du tampon Borate 0.1 M afin de neutraliser la solution. Le marquage immunohistochimique avec l'anticorps anti-BrdU est alors réalisé selon le protocole qui sera décrit plus loin, et le rapport des cellules ayant incorporé le BrdU sur le nombre de cellules totales peut être calculé.

(c) Etude du cycle cellulaire par cytométrie de flux

Cette étude repose sur le protocole élaboré par Francis Belloc et son équipe (Lacombe et al. 1988). Une fois à confluence, les cellules sont déprivées dans du milieu de déprivation pendant 16 h afin de les arrêter dans leur phase du cycle cellulaire. Remises dans leur milieu de culture, les cellules sont ensuite incubées en présence de BrdU pendant 30 min à différents temps. Les cellules en cours de phase S incorporent le BrdU à la place de la thymidine dans l'ADN néosynthétisé. Elles sont alors fixées à l'éthanol 50% et 70%, traitées à l'HCl 2N et marquées d'une part par l'anticorps anti-BrdU (Oxford Biotechnologies) suivi de l'IgG de rat couplé au FITC (Jackson ImmunoResearch), et d'autre part, par le fluorochrome PI (Iodure de Propidium) qui lui, s'intercale entre les bases de la double hélice de la molécule d'ADN. Des analyses au cytomètre de type ODAM-ATC 3000, Odam-Brucker permettent de distinguer les cellules en phase S, qui sont plus fluorescentes, des cellules en phase G1. Comme la fluorescence est directement liée à la quantité d'ADN, l'index d'incorporation du BrdU est déterminé en fonction de l'intensité de fluorescence FITC par rapport à la quantité d'ADN contenue dans les cellules. Le pourcentage de cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire est alors calculé.

(2) Migration cellulaire

(a) Migration par chimiotactisme

Pour étudier la migration dirigée des cellules, un test de migration par chimiotactisme a été utilisé à l'aide de chambres de culture cellulaire Transwell (Becton Dickinson), contenant une membrane de polycarbonate perforée par des pores de 8 μm , laissant passer les cellules en migration. Ces chambres sont placées dans des puits de 2 cm^2 , et sont recouvertes de gélatine dont le pourcentage varie selon le type cellulaire. 100 000 cellules déprivées 24 h avant le début de l'expérience sontensemencées dans chaque chambre, dans du milieu de privation 1%SVF/0.25%BSA. Deux heures plus tard, les cellules sont mises en milieu totalement dépourvu de sérum (0%), et le puits placé sous la chambre est rempli avec 800 μl de milieu DMEM à 1% ou 10% de SVF, ou de DMEM contenant 20 ng/ml de bFGF ou 40 ng/ml de VEGFA. Pour les contrôles négatifs, les puits sont remplis de DMEM dépourvu de sérum. L'ensemble est mis à incuber à 37°C, pendant 16 h, afin de laisser les cellules migrer à travers les pores. Après l'incubation, les membranes sont rincées avec du PBS1X, et les cellules sont fixées dans du PFA 2%, perméabilisées au triton X-100 0.2%, et colorées à la solution d'Hémalun de Mayer (Merck) pendant 1 min. Les cellules qui n'ont pas migré sont grattées délicatement à la surface de la membrane à l'aide d'un coton-tige. En revanche, les cellules

qui ont migré en dessous de la membrane sont comptées ; des photos de ces cellules sont prises à l'aide d'un microscope inversé Nikon, à raison de 7 champs par puits pour 3 puits par condition.

(b) Migration sur strie (Wound healing)

Pour étudier la migration sur strie des cellules, des inserts de culture cellulaire (Culture-Inserts, Ibidi) ont été utilisés. Les cellules sontensemencées à raison de 150 000 cellules par insert, et amenées à 80% de confluence avant d'être déprivées 24 h précédant le début de l'expérience. Les inserts sont alors enlevés délicatement à l'aide d'une pince, créant ainsi une strie homogène pour les différentes conditions. Les cellules sont recouvertes de milieu de privation contenant 20 ng/ml de bFGF, alors que les puits contrôles ne contiennent que du milieu de privation. La strie est photographiée aux temps 0 h et 20 h, à l'aide d'un microscope inversé Zeiss (Axio Observer) en contraste de phase, suivant ainsi le recouvrement de la strie par les cellules en migration. La surface de migration est alors calculée par la différence de surface de la strie prise au temps 20 h et celle prise au temps 0 h.

(c) Migration non directionnelle par vidéo microscopie

Pour suivre la migration non directionnelle des MEF en vidéo microscopie, les cellules sontensemencées à faible densité (15 000 cellules/cm²) dans des puits de Labtek à 4 compartiments, en fond de lamelle de verre (Labtek-II system, Nalge Nunc International Corp.). 24h après l'ensemencement, les cellules sont déprivées pendant 12 h, puis incubées avec une solution de Hoescht (10 µg/ml, Sigma) pour marquer les noyaux cellulaires. Elles sont ensuite activées avec du bFGF à 20 ng/ml, et placées sous un microscope inversé Zeiss dans une chambre à 37°C, maintenue à 5% de CO₂. Une série d'images est alors acquise toutes les 20 min, pendant 15 h, à l'objectif 10x et en contraste de phase, afin d'étudier la dynamique des cellules. Pour déterminer les trajectoires des cellules, les noyaux marqués en bleu sont suivis à l'aide du logiciel Imaris software (Bitplane), qui réalise un « tracking » des noyaux et étudie ainsi la distance (µm²) parcourue par les cellules au cours des 15 h filmées.

(d) Polarisation du Golgi

Pour déterminer la polarisation du Golgi, le modèle de migration sur strie utilisant les inserts de culture cellulaire (Ibidi) a été utilisé suivant le protocole décrit précédemment. Les cellules sont alors activées avec le facteur de croissance bFGF à 20 ng/ml, pendant 3 h, puis fixées au PFA 2% pendant 10 min. Les marquages du Golgi et du noyau sont ensuite réalisés afin d'étudier la polarisation des cellules au front de migration. Cette étude passe par deux types d'analyse du Golgi: le profil de répartition du Golgi le long de la cellule en migration, et le

volume de son Golgi. Ces paramètres sont analysés sur des images prises à un microscope inversé Zeiss (Axio Observer).

Pour étudier le profil du Golgi, une ligne a été tracée le long de la cellule, passant par le noyau et dans le sens de la migration. Le profil d'intensité exprimé en unité arbitraire (AU) de chaque fluorochrome, DAPI pour les noyaux et l'Alexa-568nm pour le Golgi, a été mesuré le long de la ligne à l'aide du logiciel Axiovision 4.7 (Zeiss), et comparé entre les deux types de cellules (**Figure 33**).

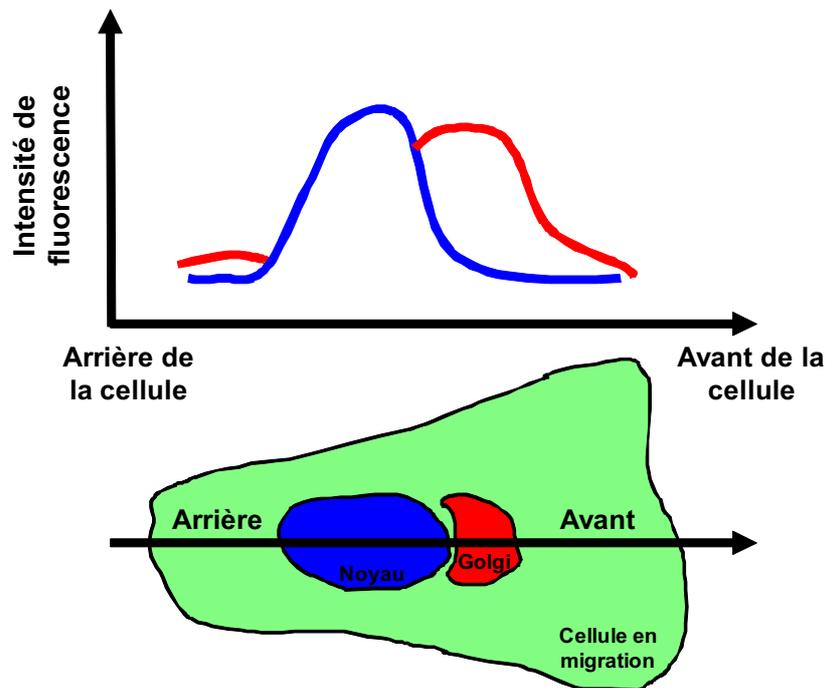


Figure 33: Schématisation de la quantification de l'analyse du profil du Golgi dans les cellules en migration

Pour mesurer le volume du Golgi, les photos ont tout d'abord été déconvoluées avec le logiciel autoQuant deconvolution (Mediacybernetics). Une reconstruction de celui-ci a ensuite été dessinée par le logiciel Imaris software Surpass (Bitplane), permettant de calculer une valeur approximative du volume dans lequel le Golgi se répartit.

Pour chaque type cellulaire, environ 50 cellules ont été examinées par expérience.

(e) Différenciation des cellules endothéliales en tubes endothéliaux

Pour l'étude de la différenciation des cellules endothéliales sur Matrigel®, le test d'angiogenèse *in vitro* a été réalisé avec les cellules endothéliales primaires isolées à partir de reins murins. Pour cela, du Matrigel® (Becton Dickinson) contenant divers facteurs de croissance est coulé dans des puits de 2 cm², et mis à gélifier pendant 1 h à 37°C. Après

trypsinisation, 150 000 cellules, déprivées 24 h avant le début de l'expérience, sont ensemencées sur le Matrigel®, dans du milieu de culture contenant 20 ng/ml de VEGFA. Après 6 h à 37°C, les cellules sont fixées au PFA 10%, et la formation des tubules est examinée sous microscope inversé Zeiss (Axio Observer), à l'objectif 10x. Dix photos par puits ont été prises, et le nombre total de branchements formant des structures tubulaires à la surface du Matrigel® est compté par champs.

c) Détection des protéines

(1) Western Blot

Les cellules en culture sont lavées 2 fois en PBS1X froid après avoir retiré le milieu, puis lysées dans du tampon RIPA (NP-40 1 %, déoxycholate de sodium 0,5%, Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) 0,1%, tampon tris pH8 50 mM) supplémenté en inhibiteurs de protéases ajoutés extemporanément (aprotinine 1 mM, leupeptine 10µg/ml, AEBSF 1 mM, benzamidine 1mM) ainsi qu'un inhibiteur de phosphatases (orthovanadate 1mM), à raison de 80 µl de RIPA par puits de 4 cm². Pour les prélèvements tissulaires, les cœurs et les reins nouveau-nés ont été congelés et broyés dans l'azote liquide puis repris dans 300 µl de RIPA.

Après centrifugation à 14 000 rpm, les surnageants sont récupérés puis dosés selon la technique de Smith utilisant le kit de dosage protéique BCA (Pierce). Le dosage s'effectue à une longueur d'onde de 562 nm.

Les extraits protéiques sont repris dans un tampon d'échantillon à 5x, le H5R (bleu de bromophénol 0.025%, SDS 2%, β-mercaptoéthanol 100 mM, glycérol 10%, Tris/HCl 100 mM pH 6,8), et bouillis à 95°C pendant 5 min afin d'être dénaturés.

Des quantités équivalentes de protéines (20 µg pour les cellules et 60 µg pour les organes) sont soumises à une électrophorèse SDS-PAGE dans un gel de polyacrilamide à 8, 10 ou 12% (selon la taille des protéines), dans un tampon de migration (Tris 5 mM, glycine 40 µM, SDS 0,2 %, pH 8,3), puis sont transférées sur une membrane PVDF (Millipore) par électrotransfert liquide dans un tampon de transfert (Tris 25 mM, Glycine 192 mM, Méthanol 20%, pH8.3) pendant 1 h, à 100V et à 4°C.

Après transfert, les membranes sont saturées pendant 30 min à température ambiante soit dans un tampon PBS-T (PBS1X + 0.05% Tween 20) contenant 10% de lait écrémé lyophilisé, soit dans un tampon PBS-T contenant 10% de BSA, suivant l'anticorps utilisé (**Tableau 10**). Elles sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire approprié, dans du tampon PBS-T 5% de lait, ou du PBS-T 5% de BSA, pendant 2 h à température ambiante ou bien toute la nuit à 4°C. Ces membranes sont rincées 3 fois 5 min dans du tampon PBS-T, incubées avec un anticorps

secondaire couplé à un fluorochrome (1/5000^{ème}) (IgG de souris AlexaFluor-700 et IgG de lapin AlexaFluor-750 (Invitrogen) ; IgG de chèvre AlexaFluor-800 (Li-cor)) pendant 1 h, dans du tampon PBS-T 5% de lait, puis rincées de nouveau 3 fois dans du tampon PBS-T.

Antigènes	Type/hôte	Référence	Provenance	Dilution
EphrinB2	Polyclonal / Chèvre	AF496	R&D system	1/200 ^{ème} , lait
α -tubuline	Monoclonal / Mouse	T6074	Sigma	1/8000 ^{ème} , lait
Phosho-Akt	Polyclonal / Lapin	9272	Cell signaling	1/3000 ^{ème} , BSA
Akt	Polyclonal / Lapin	9271		1/6000 ^{ème} , BSA
Phospho-p44/42MAPK	Polyclonal / Lapin	9101S		1/1000 ^{ème} , BSA
P44/42MAPK	Polyclonal / Lapin	9102		
Phospho-Smad2	Polyclonal / Lapin	3108		
Phospho-Smad1/5/8	Polyclonal / Lapin	9511S		
Smad2	Monoclonal / Mouse	3103		
Dvl1	Monoclonal / Mouse	sc 8025		Santacruz
Dvl3	Monoclonal / Mouse	sc 8027		1/1000 ^{ème} , lait
GFP	Monoclonal / Mouse	sc-9996	Santacruz	1/2000 ^{ème} , lait
HA	Polyclonal / Lapin	sc 805	Santacruz	1/3000 ^{ème} , lait

Tableau 9: Liste des anticorps utilisés en Western Blot

La révélation se fait avec le système Odyssey Infrared Imaging System, qui lit la fluorescence émise par les anticorps secondaires excités à une longueur d'onde précise : 700 nm pour l'IgG de souris AlexaFluor-700, 750 nm pour l'IgG de lapin AlexaFluor-750 et 800 nm pour l'IgG de chèvre AlexaFluor-800. La quantification des immunoblots est aussi réalisée avec le logiciel Odyssey. Les valeurs obtenues lors de ces quantifications sont normalisées par rapport à la quantité d' α -tubuline ou la quantité de protéine totale équivalente.

(2) Immunofluorescence

Pour l'immunofluorescence, les cellules sont cultivées dans des puits de Labtek à 4 ou 8 compartiments (Labtek-II system, Nalge Nunc International Corp.). Après lavages au PBS1X, les cellules sont fixées au PFA 2% pendant 10 min et perméabilisées au Triton X-100 0,2% pendant 2 min. Après 3 lavages au PBS1X, la saturation des sites non spécifiques est réalisée avec une solution de PBS1X contenant 5% de BSA pendant 30 min, excepté pour le marquage au BrdU où la saturation est réalisée avec une solution PBS1X contenant du sérum de cheval (HS, Sigma) à 5%. L'anticorps primaire, dilué soit dans une solution de PBS1X/BSA 1%, soit dans du PBS1X/HS 1%, est ensuite incubé toute la nuit à 4°C. Les anticorps primaires utilisés sont répertoriés dans le **tableau 11**.

Antigènes	Type/hôte	Référence/ Provenance	Dilution	AC secondaire	Dilution
CD31	Monoclonal/ Rat	T-2001 / BMA	1/100 ^{ème}	IgG rat biotinylé	1/500 ^{ème}
Isolectine B4 (biotinylé)	Griffonia Simplicifolia	B-1205 / Vector	1/50 ^{ème}	-	-
F-actin	Amanita phalloides	P5282/ Sigma	1/500 ^{ème}	-	-
α SMA	Monoclonal/ Souris	A 2547 / Sigma	1/1000 ^{ème}	IgG souris biotinylé	1/100 ^{ème}
smMHC	Polyclonal/ Lapin	BT-562 / BTI	1/200 ^{ème}	IgG lapin biotinylé	1/100 ^{ème}
BrdU	Monoclonal/ Rat	OBT 0030S / Oxford Biotechnologies	1/50 ^{ème}	IgG rat biotinylé	1/500 ^{ème}
Golgin97	Monoclonal/ Souris	A21270 / Invitrogen	1/100 ^{ème}	IgG souris biotinylé	1/100 ^{ème}
Fzd4	Polyclonal/ Chèvre	AF 194 / R&D system	1/1000 ^{ème}	IgG chèvre biotinylé	1/500 ^{ème}
Fzd7	Polyclonal/ Chèvre	AF 198/ R&D system	1/1000 ^{ème}	IgG chèvre biotinylé	1/500 ^{ème}
myc	Monoclonal/ Souris	5724 / Upstate	1/1000 ^{ème}	IgG souris biotinylé	1/100 ^{ème}

Tableau 11: Liste des anticorps utilisés en immunofluorescence

Trois lavages de 5 min au PBS1X sont ensuite réalisés puis l'anticorps secondaire couplé à la biotine (souris/lapin : Amersham Biosciences ; chèvre/rat : Jackson Immunoresearch Laboratories) est incubé 1 h 30 à température ambiante. Suite à trois lavages au PBS1X, le complexe streptavidine couplé au fluorochrome Alexa-568nm (rouge) ou Alexa-488nm (vert) (1/400^{ème}, Invitrogen) est incubé pendant 30 min à température ambiante. Trois lavages au PBS1X sont effectués. Pour le marquage des cellules endothéliales à l'isolectineB4, les cellules sont incubées avec la GS-isolectineB4 qui est déjà biotinylée (A 2547, Vector). Pour le marquage de l'actine-F, les cellules sont incubées avec la phalloïdine couplée au FITC

(dilué au 1/500^{ème}, Sigma). Les lames sont alors montées dans du milieu de montage Vectashield-DAPI, qui permettra aux noyaux des cellules d'être colorés en bleu (Vector laboratories). Les lames sont alors observées sous fluorescence grâce à un microscope inversé Zeiss (Axio Observer) et à un microscope confocal Nikon (Eclipse E800).

(3) *Activité luciférase*

Afin d'étudier l'implication des isoformes de Dvl et Fzd4 dans la voie canonique, un système rapporteur spécifique a été utilisé.

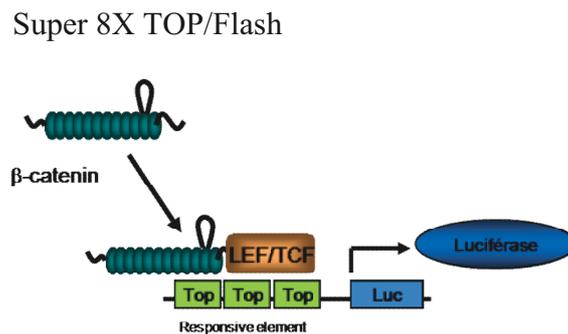


Figure 34 : Système rapporteur Super 8X TOP/Flash de la voie canonique

La transactivation de la β -caténine est mesurée à l'aide d'un système de gène rapporteur possédant 8 sites de fixation pour la β -caténine et codant pour une luciférase (Firefly Luciferase). Lorsque la β -caténine est transloquée dans le noyau, elle se fixe sur sa séquence de fixation du gène rapporteur et active ainsi la transcription de la luciférase. Son activité lumineuse est mesurée au luminomètre (TD-20/20, Turner Designs) (**Figure 34**).

Ainsi, 24 h après ensemencement des cellules 293TG dans des puits de 2 cm², les cellules sont transfectées par Lipofectamine, suivant le protocole décrit pour la transfection des cellules, avec certains plasmides répertoriés dans le **tableau 9**, aux concentrations suivantes (**Tableau 12**). Comme la concentration finale des plasmides change (1.875 μ g/ml en condition 1 seul plasmide et 2.125 μ g/ml en condition 2 plasmides), les volumes de réactif et de lipofectamine sont modifiés.

	Condition : 1 seul plasmide	Condition : 2 plasmides
Super 8X TOP/Flash	0.75 µg/ml	0.75 µg/ml
Rénilla Luciférase	0.375 µg/ml	0.375 µg/ml
Plasmide 1	0.75 µg/ml	0.5 µg/ml
Plasmide 2	-	0.5 µg/ml
Réactif	2.8 µl	3.2 µl
Lipofectamine	1.875 µl	2.13 µl
Volume final OptiMEM (pour un puits de 4 cm ²)	625 µl	710 µl

Tableau 12: Les différentes concentrations de plasmides et de réactifs du kit Lipofectamine utilisées pour le test de l'activité luciférase

Dans cette expérience, les cellules sont co-transfectées avec le plasmide codant pour le gène rapporteur de la voie β -caténine (Super 8X TOP/Flash), avec un autre plasmide codant pour l'expression de la Renilla Luciférase qui permettra de normaliser les différentes conditions (contrôle de transfection), et avec le/les plasmide(s) d'intérêt. Après 48 h, l'activité luciférase est quantifiée en respectant le protocole Dual-Luciférase Reporter Assay System (Promega). Tous les puits sont rincés une fois au PBS1X, puis les cellules sont lysées dans le tampon de lyse du kit ramené à 1X dans de l'eau. Les lysats sont récupérés dans des eppendorfs et centrifugés 10 min à 15 000 tours/min à 4°C. Pour procéder aux essais luciférase, 10 µl de chaque lysat sont combinés à 50 µl de réactif d'essai *Luciferase assay Reagent* (LAR II, Promega). Une première mesure de luminosité est alors quantifiée sur le luminomètre. Cette lecture quantifie la lumière émise par la Firefly Luciférase issue de l'expression du gène rapporteur. Puis 50 µl de solution Stop & Glo, inhibant la Firefly Luciférase et activant la Renilla Luciférase, sont ajoutés et une deuxième mesure de luminosité est quantifiée. Cette lecture quantifie l'activité luciférase Renilla. La mesure de l'activité luciférase est réalisée sur 3 puits par condition. Pour chaque condition, nous avons calculé le rapport de l'activité Firefly luciférase sur l'activité Renilla. Ce rapport est normalisé par rapport au puits contrôle.

Un contrôle de l'activation du système est réalisé par l'ajout de Chlorure de lithium (LiCl) à 20 nM, 48 h avant l'arrêt de l'expérience. Le LiCl est un inhibiteur de la GSK3 β , la kinase qui est impliquée dans le complexe de dégradation de la β -caténine. Lorsque la GSK3 β est

inhibée par le LiCl, la β -caténine n'est plus dégradée, et peut être transloquée dans le noyau, se fixer sur les sites spécifiques et induire le gène de la luciférase. Le traitement au LiCl mime donc l'activation de la voie Wnt canonique et sert de contrôle positif au système.

d) Détection des ARN messagers

(1) Extraction des ARN totaux et dosage

L'extraction des ARN totaux a été réalisée à partir d'organes de souris nouveau-nés (Reins et Cœurs) ou de culots cellulaires. Le culot cellulaire a tout d'abord été lysé dans 800 μ l de TriReagent (Euromedex). Pour les organes, les tissus ont été au préalable broyés avec des billes dans le TriReagent à l'aide d'un broyeur (Qiagen). L'ARN total a ensuite été extrait par une méthode phénol/chloroforme, selon les instructions du fournisseur. Brièvement, l'addition de chloroforme (200 μ l pour 800 μ l de TriReagent) suivie d'une centrifugation (15 min, 12 000 g, 4°C) a permis la séparation de la phase aqueuse contenant les ARN, de l'interface et de la phase organique contenant les ADN et les protéines. Une fois prélevés, les ARN ont été précipités par addition d'isopropanol volume à volume. Le culot, préalablement lavé à l'éthanol 70%, a été repris dans 30 μ l au total contenant notamment un traitement DNase (Qiagen) permettant à l'ADN génomique résiduel d'être éliminé. Les ARN ainsi obtenus ont été conservés à -20°C.

Le dosage des ARN se fait par spectrophotométrie UV en mesurant l'absorbance de chaque échantillon à la longueur d'onde de 260 nm. Le rapport $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ doit être compris entre 1,8 et 2.

(2) Transcription inverse

Cette réaction enzymatique permet la synthèse d'un brin d'ADN complémentaire à partir d'une molécule d'ARN donnée. La transcriptase inverse utilise une amorce nucléotidique oligo-dT complémentaire de la queue polyA présente à l'extrémité 3' des ARNm. Un microgramme d'ARN est donc incubé dans un mélange réactionnel (20 μ l au final) contenant 4 μ l de tampon RT (250 mM Tris-HCl pH8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl_2 et 50 mM DTT), 1 μ l d'oligo-dT (20 μ M), 2 μ l de dNTP (10 mM chacun), 1 μ l d'inhibiteur de RNases et 1 μ l de Murine-Moloney Leukemia Virus (M-MLV) RNase H-Reverse Transcriptase (Promega). La réaction se déroule pendant 1 h 30 à 42°C, puis est stoppée à 65°C pendant 10 min. L'ADNc obtenu est complété à 150 μ l par de l'eau qsp, et conservé à 4°C.

(3) PCR quantitative

La PCR quantitative a été réalisée avec le mix IQ SYBR Green supermix (Bio-Rad). Deux microlitres d'ADNc sont mélangés à 7.5 µl de tampon SYBR Green, 0.5 µl de chaque amorce (sens, antisens) et à de l'eau qsp 15 µl. Le logiciel MJ Research Opticon et les paramètres suivants ont été utilisés pour cette réaction: 5 min de dénaturation à 95°C suivi de 34 cycles de 30 sec de dénaturation à 95°C, 1 min d'hybridation à 60°C, 1 min d'élongation à 72°C, 1 min à 76°C et 1 min à 80°C. Les amorces utilisées sont répertoriées dans le **Tableau 13**.

Gène	Sens	Séquence 5' → 3' 3' ← 5'
	Antisens	
<i>m/hP0</i>	F B	GCGACCTGGAAGTCCAAC CCATCAGCACCACAGCCTTC
<i>mβ-actine</i>	F B	GGAGGAAGAGGATGCGGCA GAAGCTGTGCTATGTTGCTCTA
<i>hβ-actine</i>	F B	GGAGGAGCTGGAAGCAGCC GCTGTGCTACGTCGCCCTG
<i>mFzd4</i>	F B	TGACAACCTTTCACGCCGCTC TACAAGCCAGCATCGTAGCCACAC
<i>hFzd4</i>	F B	GCTGACAACCTTTCACACCGCTC AAGGGCACCTCTTCATCACCTG
<i>mE2F1</i>	F B	ATCTGACCACCAAACGCTTC TCAAGCCGCTTACCAATCCC
<i>mTGFβR2</i>	F B	AGTCCTGCATGAGCAACTGC TCGCCCGCCCTTTTCTTTTC
<i>mTGFβ</i>	F B	TGCTCTTGTGACAGCAAAG GGAGCTGAAGCAATAGTTGG
<i>mbFGF</i>	F B	CCAAGCAGAAGAGAGAGGAGTTGTG TGCCCAGTTCGTTTCAGTGC
<i>mFlk1</i>	F B	GCCTACCTCACCTGTTTCCTGTATG TTACTTCTGGTTCCTCCAATGGG
<i>mEphrinB2</i>	F B	AAGCCAAAGGTCAAACAGG CACGGCCATAAACCAAAAAC
<i>mEphB4</i>	F B	AATGCCACAGCCTTAGACAG AGAATCCCCTTCCAAGCACC
<i>mDvl1</i>	F B	TATGTCTTTGGCGACCTGTGC TGCTCTTGCTCCCTTCACTCTG
<i>mDvl2</i>	F B	GTAGGCGAGACGAAGGTGATTTAC TTGAAGCAAGGTAGGCGGGCATTG
<i>mDvl3</i>	F B	TTTGGGGTGGTGAAGGAAGAG TCTCCGTGTCATTGTCCAGATTC

Tableau 13: Amorces utilisées pour la PCR quantitative

Certains produits de PCR quantitative ont aussi été visualisés sur gel d'agarose à 3%, selon la même méthode que pour le génotypage des souris. Dans ce cas précis, les 15 μ l de produits de PCR ont été additionnés avec 15 μ l de tampon 2x GoTaq (Promega).

3. Mise au point des outils

a) Caractérisation des cellules primaires

(1) Cellules endothéliales rénales primaires

Après marquage CD31 et IsolectinB4 des cellules endothéliales purifiées à partir de reins, 85% des cellules (comparées au nombre de cellules totales) sont positives pour ces marqueurs (**Figure 35**).

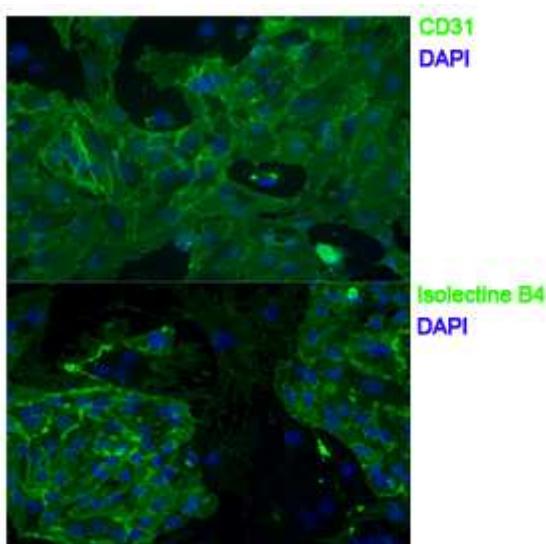


Figure 35 : Marquage CD31 et IsolectineB4 des cellules endothéliales rénales primaires purifiées sur billes magnétiques

(2) Cellules musculaires lisses aortiques primaires

Après marquage α SMA et smMHC des cellules musculaires lisses isolées à partir d'aortes, 80% des cellules (comparées au nombre de cellules totales) sont positives pour ces marqueurs (**Figure 36**). Il reste néanmoins plusieurs cellules endothéliales (révélées par un marquage CD31), mais qui sont éliminées par les CML au fur et à mesure des passages.

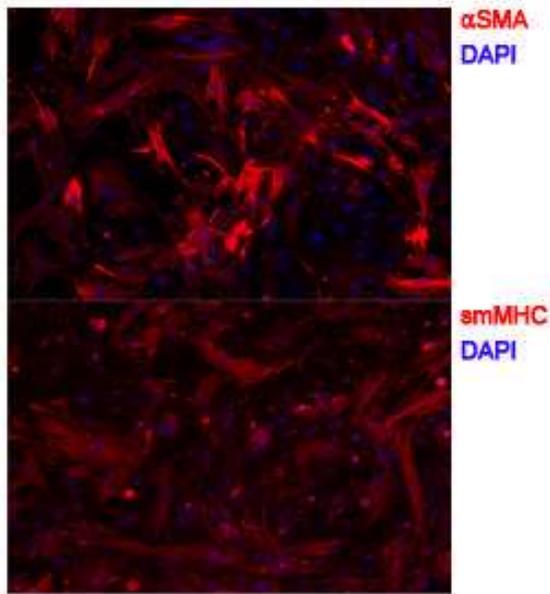


Figure 36 : Marquage α SMA et smMHC des cellules musculaires lisses aortiques primaires purifiées par digestion enzymatique

b) Validation par qPCR de l'inhibition du gène *fzd4* par ARN interférence dans les HMEC-1 et les MEF

La validation de la fonctionnalité des siRNA par qRT-PCR a été réalisée sur le taux d'ARNm endogène. D'après la **figure 37**, on peut voir que le siRNA dirigé contre *hfzd4* induit une extinction du gène *hfzd4* de $72 \pm 13\%$ dans les cellules HMEC-1. De même, le siRNA dirigé contre *mfzd4* diminue l'expression du gène *mfzd4* de $63 \pm 23\%$ dans les cellules MEF.

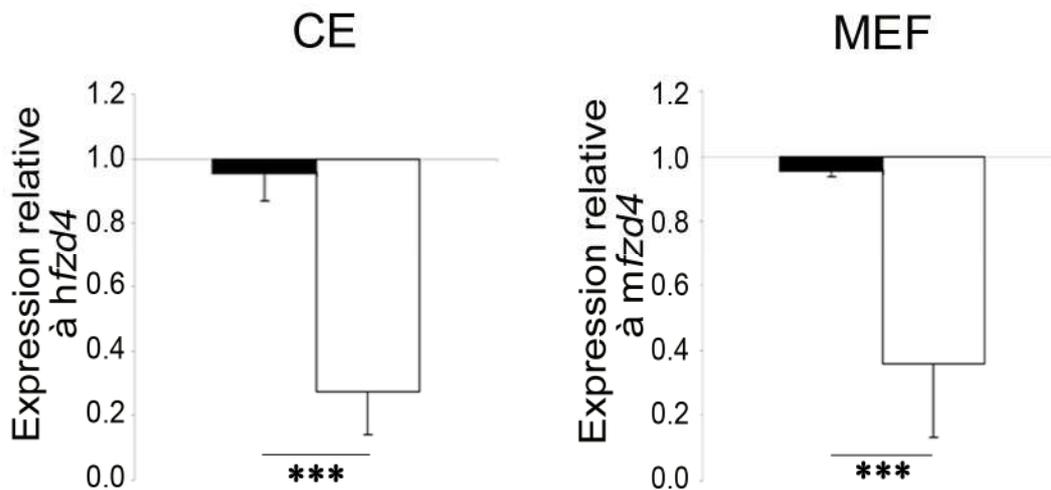


Figure 37 : Analyse par qPCR du niveau d'expression d'ARNm endogène de *hfzd4* dans les cellules HMEC-1 et de *mfzd4* dans les MEF (rapporté à un standard P0 ou β -actine)

***, $p < 0.001$

4. Double hybride

Ce double hybride réalisé chez la levure sur la forme Dv13 déléetée de son domaine DIX a été entièrement réalisé au laboratoire par Béatrice Vinassa. Le principe et la réalisation de cette méthode sont décrits car les résultats obtenus seront nécessaires à la suite de ce projet.

a) Principe du double hybride

Le système du double-hybride est basé sur la nature modulaire de nombreux activateurs transcriptionnels eucaryotes, comme la protéine de levure GAL4. Ces activateurs contiennent deux domaines séparables : un domaine de liaison à l'ADN et un domaine d'activation de la transcription. Le domaine de liaison à l'ADN permet de localiser le facteur de transcription sur des séquences d'ADN spécifiques situées en amont des gènes qui sont régulés par ce facteur. Le domaine d'activation sert à établir un contact avec les constituants de la machinerie transcriptionnelle de manière à initier le processus de transcription. Les activateurs tels que la protéine VP16 du virus de l'herpès ne se lient pas directement à l'ADN. Ils agissent en se liant à d'autres protéines qui sont fixées sur des sites spécifiques de l'ADN. La structure des activateurs transcriptionnels est donc suffisamment modulaire pour qu'on puisse générer un hybride fonctionnel en découpant et recollant des morceaux de protéine grâce à la technologie de l'ADN recombinant.

Avant de commencer à expliquer le système du double-hybride, il est utile de rappeler que dans la levure, les gènes nécessaires au métabolisme du galactose sont contrôlés par deux protéines régulatrices, GAL4 et GAL80 ainsi que par la source de carbone dans le milieu. Lorsqu'il y a du galactose, la protéine GAL4 se lie à des séquences situées dans les UAS (Upstream Activating Sequences) pour répondre au galactose. En absence de galactose, GAL80 se lie à GAL4 et cette interaction bloque l'activation transcriptionnelle.

Le principe du double hybride est le suivant (**Figure 38**). Il faut construire des plasmides qui codent pour deux protéines hybrides : la première est constituée du domaine de liaison à l'ADN de GAL4 fusionné à la protéine X alors que l'autre est constituée du domaine d'activation de la transcription de GAL4 fusionné à la protéine Y. Ces plasmides sont transformés dans une souche de levure *Saccharomyces cerevisiae* qui contient des gènes rapporteurs dont les régions régulatrices contiennent des sites de liaison pour GAL4. Chacune des protéines hybrides prise isolément est incapable d'activer la transcription du gène rapporteur : l'hybride avec le domaine de liaison à l'ADN n'a pas la fonction d'activation tandis que l'hybride avec le domaine d'activation ne peut se fixer sur les sites de liaison à

GAL4. L'interaction entre les protéines X et Y reconstitue un GAL4 fonctionnel qui permet l'expression du gène rapporteur.

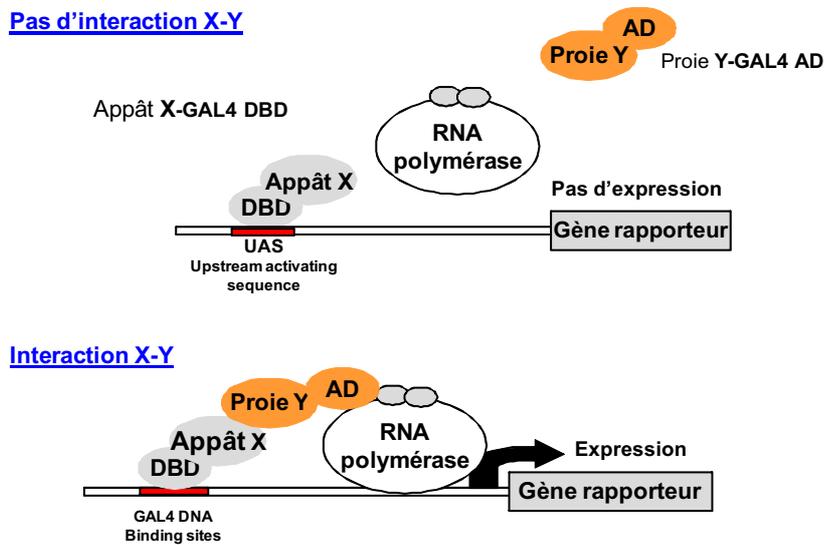


Figure 38 : Principe du double hybride

b) Procédure expérimentale

(1) Clonage de la construction Dvl3ΔDIX dans le vecteur appât pGBKT7

Ce clonage a été réalisé à partir du vecteur pmaxFP-mDvl3-ΔDIX-Green N Final (**Tableau 9**), déjà disponible au laboratoire. Le but a été d'isoler la partie Dvl3 délétée du domaine DIX (mDvl3-ΔDIX) du vecteur pmaxFP-Green, et de l'insérer dans le vecteur d'expression eucaryote pGBKT7 (Kan^r, Tryptophane (TRP), étiqueté c-Myc) contenant le domaine de liaison à l'ADN de Gal4 (DNA-BD) (**Figure 39**).

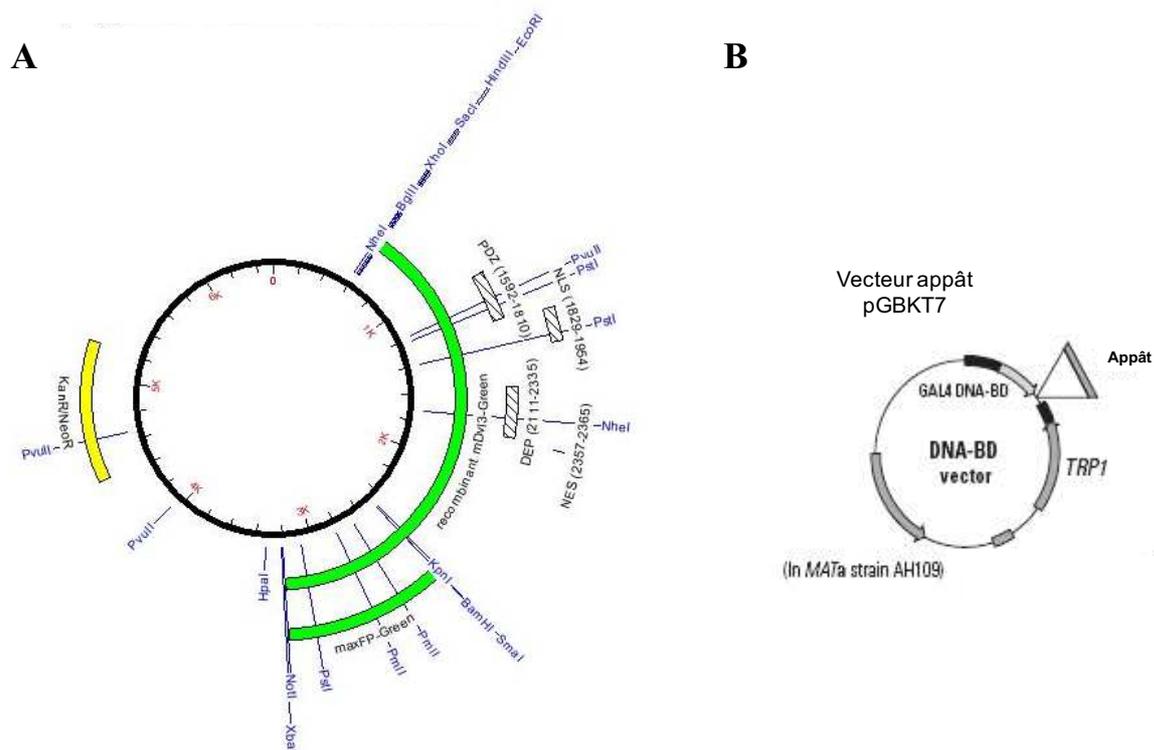


Figure 39: Carte du pmaxFP-mDvl3-ΔDIX-Green N Final (A) et du vecteur pGBKT7 (B)

Pour cela, le vecteur pmaxFP-mDvl3-ΔDIX-Green N Final a été digéré par les enzymes de restriction EcoRI et BamHI : 6 µg du vecteur sont mis en présence d'une solution contenant 5 µl de Tampon EcoRI (Fermentas), 3 µl d'enzyme EcoRI (Fermentas) et 50 µl d'eau qsp pendant 1 h, à 37°C. La solution digérée est ensuite purifiée sur colonne à l'aide du kit EZ-10 Column DNA Minipreps Kit (Bio Basic Inc.) selon le protocole du fournisseur, puis la 2^{ème} digestion par BamHI est effectuée en mélangeant 43 µl du vecteur digéré par EcoRI avec 5 µl de tampon BamHI (Fermentas) et 2 µl d'enzyme BamHI (Fermentas).

Le produit de digestion est ensuite déposé sur un gel d'agarose à 2%. Deux bandes sont obtenues, qui correspondent au vecteur pmaxFP-Green et à l'insert mDvl3-ΔDIX. La bande correspondant à la taille de l'insert est excisée du gel et récupérée dans un volume de 50 µl d'eau, puis purifiée sur colonne.

L'insert est ensuite ligué au vecteur pGBKT7 (préalablement digéré avec les enzymes EcoRI et BamHI selon le même protocole que la digestion du vecteur pmaxFP-mDvl3-ΔDIX-Green N Final) dans une solution contenant 1 µl de Tampon 10X T4 DNA ligase (Fermentas) et 1 µl d'enzyme T4 DNA ligase (Fermentas) pour 100 ng de vecteur insert. Cette réaction se fait pendant 1 h, à température ambiante.

Le produit de ligation est introduit dans des bactéries compétentes (DH5-α, Invitrogen) par choc thermique. Celui-ci est réalisé en mélangeant 50 µl de bactéries avec 1/5^{ème} de produit de

ligation et en les plaçant à 42°C pendant 20 secondes, puis dans la glace pendant 30 min. 250 µl de milieu Luria Broth (LB) liquide sont alors rajoutés, et les bactéries sont mises à agitation pendant 1 h à 37°C. Les bactéries sont étalées sur une boîte LB agar contenant de la kanamycine à 100 µg/µl et incubées toute la nuit à 37°C.

Le lendemain, une fois poussées, les bactéries contenant le vecteur d'intérêt sont amplifiées en les cultivant toute la nuit dans 250 ml de milieu LB liquide contenant de la kanamycine à 100 µg/µl, sous agitation à 37°C. Les préparations sont réalisées à l'aide du kit NucleoBond®EF AX500 (Macherey-Nagel), suivant le protocole décrit par le fournisseur.

Après cette étape, nous avons enfin obtenu le plasmide Dvl3ΔDIX cloné dans le vecteur pGBKT7 (Dvl3ΔDIX-BD).

(2) Double hybride

Pour cette procédure expérimentale, c'est le système de double hybride MatchMaker system3 (#K1612-1, Clontech), disponible dans le commerce, qui a été utilisé pour rechercher des partenaires intracellulaires à la forme Dvl3ΔDIX. Pour réaliser cette expérience, nous avons suivi les instructions du fournisseur.

Le système se base sur l'utilisation de deux types de levures : les souches de levures *Saccharomyces cerevisiae* AH109 et Y187.

La souche AH109 possède 4 systèmes rapporteurs différents nommés ADE2, HIS3, LacZ et MEL1. Ces gènes rapporteurs sont sous le contrôle de séquences régulatrices distinctes GAL4 dérivées des promoteurs GAL1 UAS, GAL2 UAS, MEL1 UAS et MEL2 UAS respectivement pour HIS3, ADE2, LacZ et MEL1 (**Figure 40**). AH109 est la souche de levure qui est transformée avec l'appât, c'est-à-dire avec la construction Dvl3ΔDIX-BD.

La souche Y187 possède 2 systèmes rapporteurs, LacZ et MEL1 (**Figure 40**). Cette souche a été prétransformée avec une banque d'ADNc d'embryons de souris à 11.5 dpc construite dans un vecteur pGADT7 (Amp^r, Leucine (LEU) étiqueté HA) contenant le domaine d'activation de Gal4 (DNA-AD).

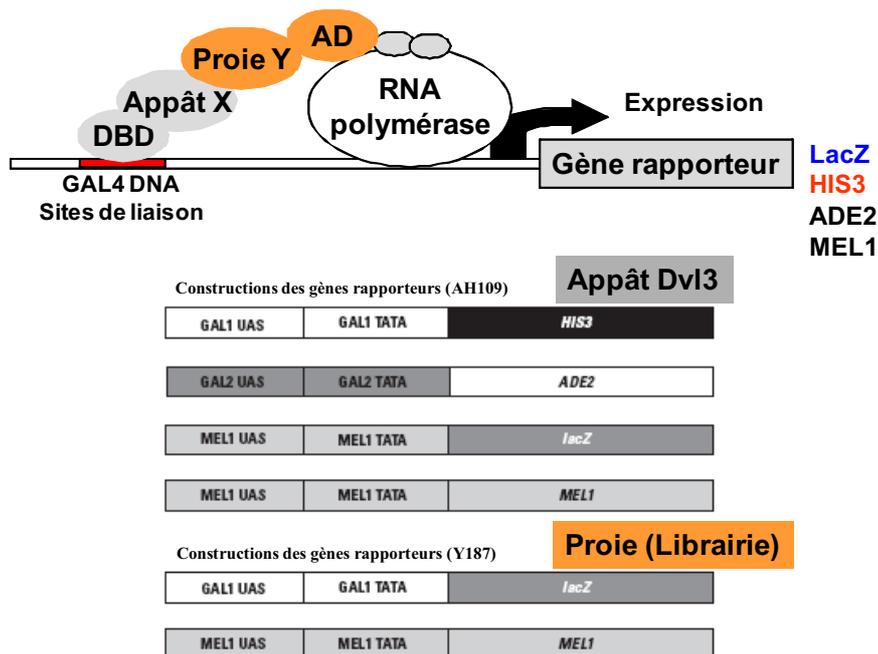


Figure 40: Systèmes rapporteurs des souches AH109 (Appât) et Y187 (Proie)

La transformation des levures a été réalisée à l'acétate de lithium (LiAc) et les levures sont ensuite étalées sur un milieu approprié pour sélectionner les transformants qui contiennent les plasmides présents dans le milieu de transformation. En effet, les levures sont mises à pousser sur des milieux sélectifs. Ces milieux synthétiques (milieu SD) consistent en une source d'azote, une source de carbone et une solution « dropout ». La solution dropout contient des nutriments essentiels, comme des acides aminés et des nucléotides, mais certains de ces acides aminés ne sont volontairement pas ajoutés de manière à sélectionner les transformants qui portent le gène nutritionnel correspondant. Par exemple, le dropout sans leucine est utilisé pour sélectionner les cellules contenant le vecteur pGADT7 (avec le gène *LEU*).

Les deux types de levures sont ensuite incubés ensemble dans leur milieu de culture liquide toute la nuit à 37°C, puis étalées sur un milieu sélectif. Ainsi, lorsque les 2 souches fusionnent, les levures deviennent auxotrophes pour la leucine et le tryptophane. Une fois que la proie et l'appât interagissent ensemble, les 2 souches deviennent aussi auxotrophes pour l'histidine et l'adénine. L'interaction protéine-protéine est donc repérée en évaluant la croissance des levures diploïdes sur milieu solide dépourvu de TRY, de LEU, de HIS, de ADE et par hydrolyse du substrat de MEL1 : l' α -galactosidase (coloration bleue) (**Figure 41**).

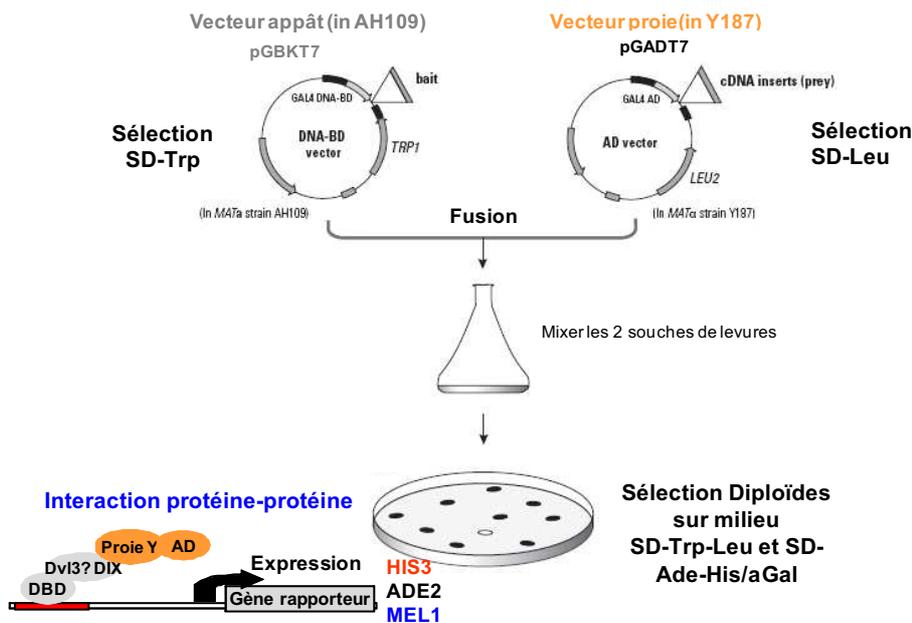


Figure 41: Schématisation du protocole de double hybride

(3) Extraction des clones obtenus

Plus de 500 clones ont été obtenus. Les plasmides d'une centaine de clones sont extraits directement à l'aide du kit RPM Yeast Isolation kit (MP Biomedicals). Ils sont ensuite soumis à une PCR afin de les amplifier, mais aussi afin de vérifier s'il n'y a qu'une seule construction par levure (**Figure 42**). En effet, il y a souvent plus d'un plasmide de la banque qui rentre dans la levure, comme c'est le cas pour le clone 4 de la **figure 42**. En théorie, 50% des bactéries transformées contiennent un plasmide de la banque. Le protocole de PCR est le même que celui décrit précédemment. Les amorces ont été synthétisées chez Invitrogen: F : 5'-CTATTCGATGATGAAGATACCCACCAAACCC-3' et B : 3'-GTGAACTTGCGGGGTTTTTCAGTATCTACGAT-5'.

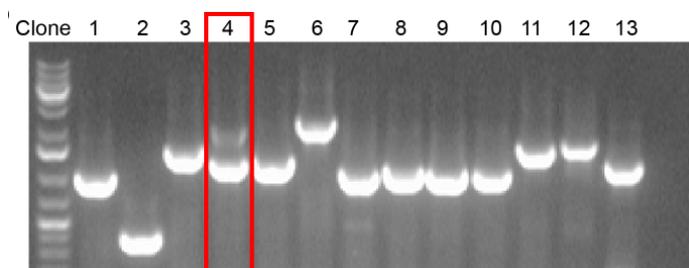


Figure 42: PCR sur les clones obtenus par double hybride

Les produits de PCR sont ensuite séquencés afin d'identifier les protéines qui ont interagité avec la construction Dvl3ΔDIX.

B. Résultats

1. Analyse *in vivo* de l'implication de Fzd4 dans la régulation de la morphogenèse vasculaire

L'étude de la participation de Fzd4 dans la formation des vaisseaux a pu être réalisée par l'obtention de souris transgéniques, délétées pour le gène codant pour le récepteur Fzd4 (*fzd4::lacZ* knock-in allele ; J. Nathans, Baltimore, USA). Des études précédentes ont montré que les souris *fzd4*^{-/-} ne sont pas fertiles, qu'elles sont de taille réduite et ont un poids inférieur aux souris sauvages (Hsieh et al. 2005; Wang et al. 2001) (**Figure 43**).

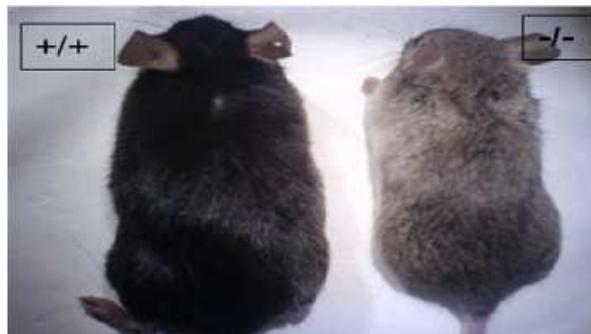


Figure 43: Souris *fzd4*^{+/+} versus *fzd4*^{-/-}

a) Profil d'expression vasculaire de Fzd4

Pour étudier la fonction du récepteur Fzd4, nous avons tout d'abord étudié le profil d'expression vasculaire de *fzd4* *in vivo*. Pour cela, nous avons travaillé sur des souris hétérozygotes *fzd4*^{+/*LacZ*}, qui présentent un allèle sauvage et un allèle exprimant le rapporteur β galactosidase (β gal). Nous avons ainsi pu visualiser les cellules qui expriment *fzd4* à l'aide du rapporteur β gal qui est sous le promoteur du gène *fzd4*. Nous avons déterminé l'expression de Fzd4 dans différents territoires. Nous observons dans la **figure 44** l'expression de *fzd4* au niveau du cœur, dans les coronaires (**a**). Fzd4 est aussi exprimé dans la vasculature des reins (**b**) et du muscle de la patte (**c**).

Dans la vasculature, *fzd4* est exprimé dans la couche musculaire et dans la couche endothéliale (**d et e**). En **e**, le double marquage CD31 et Xgal du tissu montre une expression de *fzd4* dans les CE des petites artères d'environ 20 μ m de diamètre du muscle de la patte.

De plus, de façon intéressante, nous avons déterminé une expression spécifique de *fzd4* dans les artères élastiques de gros calibre, comme dans l'aorte (**d**) et la carotide (**f**); l'expression du rapporteur β gal n'a pas été détectée dans les veines sur les coupes de tissus. On peut notamment le voir sur une coupe du bloc jugulaire, où la carotide présente un marquage Xgal

alors que la veine jugulaire n'en présente pas (f). Fzd4 aurait donc plutôt un profil d'expression artériel et non veineux.

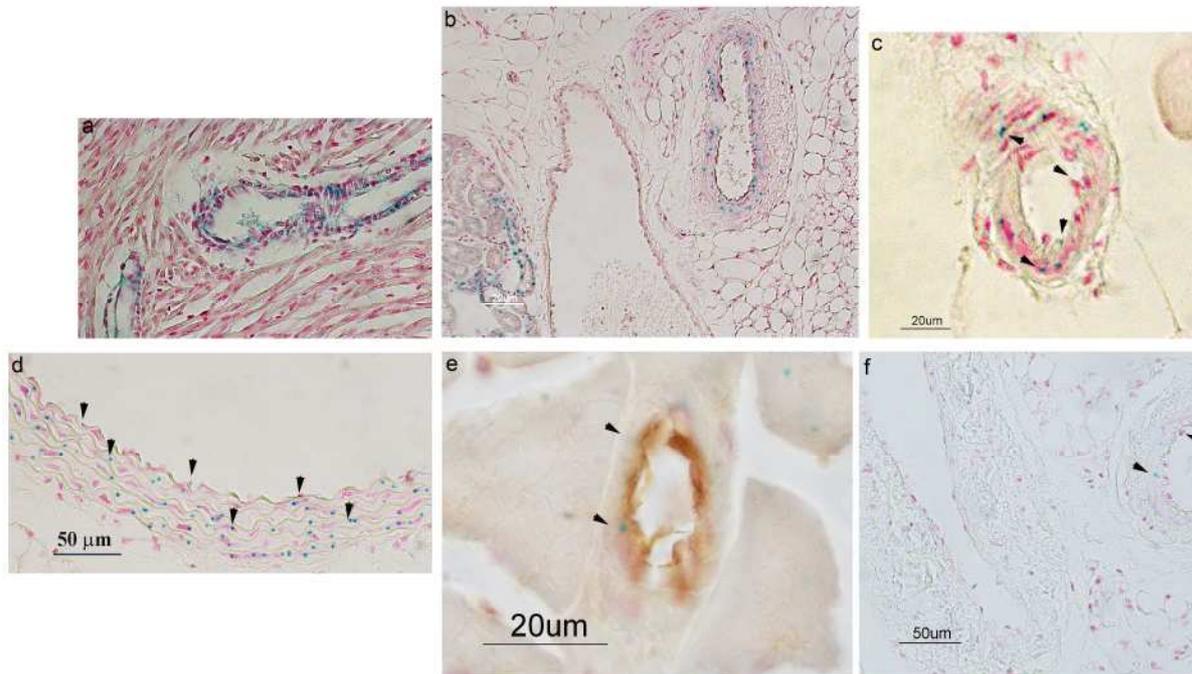


Figure 44: Profil d'expression vasculaire de *fzd4*

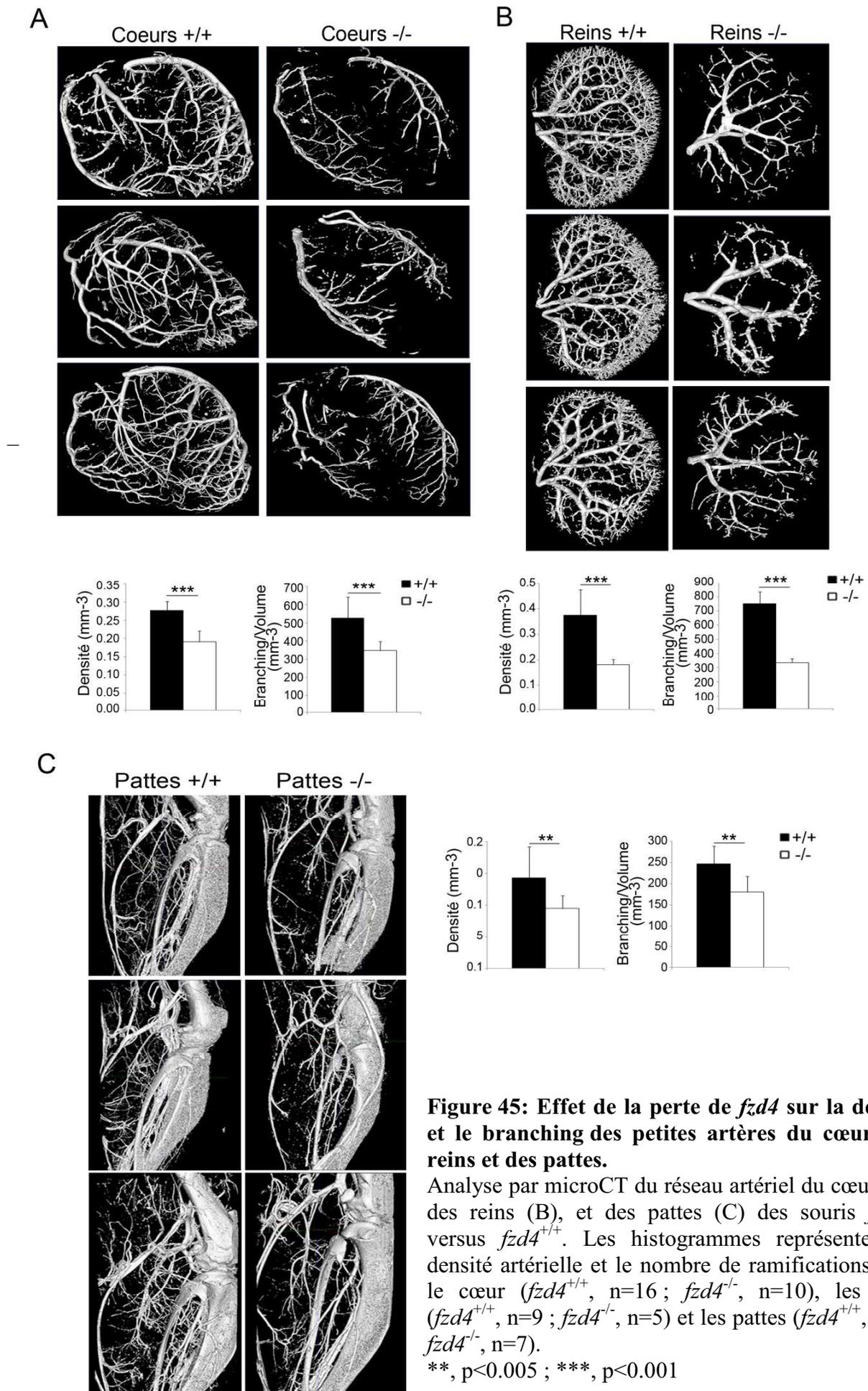
Analyse par immunohistochimie de l'expression de *fzd4* dans différents territoires vasculaires après révélation Xgal sur coupe de tissus de souris *fzd4*^{+/-} hétérozygotes. On note une expression de *fzd4* dans : a : Coronaire; b : Vaisseaux dans le rein; c : Petite artère du muscle de la patte; d : Aorte; e : Petite artère du rein (le tissu présente un double marquage Xgal (bleu)/CD31 (marron) afin de visualiser le rapporteur βgal dans les CE) ; f : Bloc jugulaire/ Veine jugulaire à gauche et carotide à droite.

b) Effet de la délétion de *fzd4* sur le réseau artériel

Suite à ce profil d'expression artériel, nous avons analysé le réseau artériel de différents organes des souris *fzd4*^{-/-} versus souris sauvages en microscanner (microCT). Le microCT a mis en évidence un réseau artériel du rein et du cœur fortement altéré pour les souris *fzd4*^{-/-}, où l'on observe une artérialisation incomplète (**Figure 45**). Dans le cœur *fzd4*^{+/+}, les larges coronaires enferment le cœur et se divisent pour donner naissance à un réseau artériel jusqu'à l'apex, qui pénètre et perfuse le cœur. Chez les souris *fzd4*^{-/-}, les principales coronaires sont présentes alors que le réseau des petites artéριοles manque, principalement à l'apex (**Figure 45A**). De même, dans les reins *fzd4*^{+/+}, l'artère rénale principale du hile rénal se divise en segments artériels, puis en artères lobaires, qui approvisionnent un réseau de capillaires dense dans le cortex. L'analyse des reins *fzd4*^{-/-} montre une perte des petites artères, particulièrement dans le cortex, alors que l'architecture artérielle principale dans le hile est conservée (**Figure 45B**).

La quantification de ces images par le logiciel Bone Analysis® met en évidence une densité artérielle et un nombre de ramifications (branching) fortement réduits dans ces organes.

Le cœur et les reins des souris *fzd4*^{-/-} ne sont pas les seuls organes touchés, puisque l'on retrouve le même phénotype artériel dans le muscle de la patte, à savoir un réseau artériel incomplet qui touche essentiellement les petites artères. Dans ce tissu, l'analyse quantitative montre que la densité artérielle et le « branching » sont également diminués (**Figure 45C**).



L'altération du réseau artériel des cœurs et des reins $fzd4^{+/+}$ et $fzd4^{-/-}$ s'accompagne d'une diminution de la perfusion de chacun de ces organes démontrée par une analyse histologique réalisée sur des coupes sagittales de cœur et de rein (**Figure 46**). En effet, le marquage de ces coupes réalisé avec l'anticorps anti-TER 119 montre une diminution du nombre d'érythrocytes, démontrant la perte de la perfusion sanguine, et donc une altération de la densité vasculaire, dans chacun de ces organes $fzd4^{-/-}$.

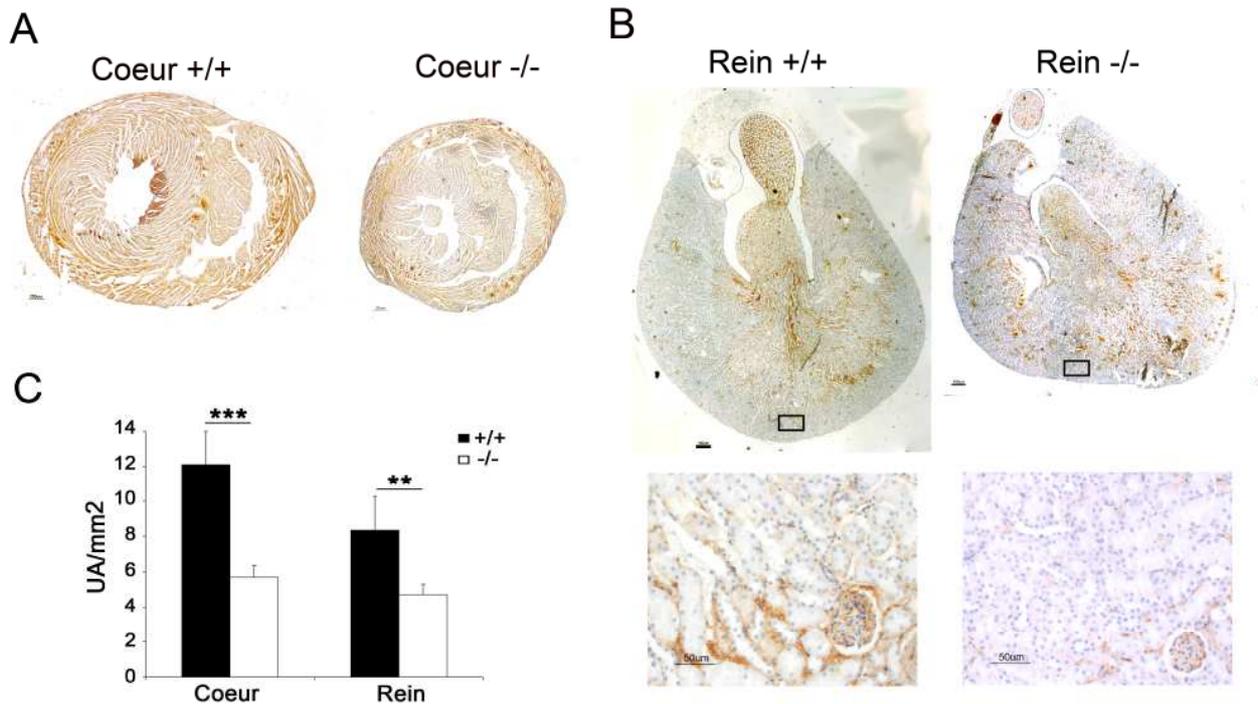


Figure 46: Effet de la délétion de $fzd4$ sur la perfusion sanguine du cœur et des reins de souris $fzd4^{-/-}$ versus $fzd4^{+/+}$

Analyse du marquage des érythrocytes sur des coupes sagittales du cœur (A) et du rein (B) de souris $fzd4^{-/-}$ versus $fzd4^{+/+}$. L'histogramme représente la quantification de la coloration des érythrocytes par rapport à la surface (UA/mm²) (C).

De plus, par analyse confocale, la densité vasculaire a été analysée sur des coupes de cœur et de rein $fzd4^{-/-}$ versus $fzd4^{+/+}$ après un marquage avec des anticorps dirigés contre CD31 (CE) et α SMA (CML). Après reconstruction des images par le logiciel Imaris software Surpass (Bitplane), une quantification du volume dans lequel se répartit le marquage CD31 et α SMA par unité de volume de tissu (Vv) révèle une densité vasculaire fortement diminuée dans les cœurs et les reins $fzd4^{-/-}$ comparée à celle obtenue dans les organes des souris sauvages (**Tableau 14**).

Analyse Imaris		<i>fzd4</i> ^{+/+}	<i>fzd4</i> ^{-/-}
Cœur	Densité du marquage CD31 Vv (%)	22.04 ± 11.94	1.80 ± 0.34*
	Densité du marquage αSMA Vv (%)	6.13 ± 3.24	2.74 ± 0.82*
Rein	Densité du marquage CD31 Vv (%)	13.90 ± 2.75	3.12 ± 1.05****
	Densité du marquage αSMA Vv (%)	12.87 ± 6.71	1.91 ± 0.70****

Tableau 14: Effet de la délétion de *fzd4* sur la densité vasculaire du cœur et des reins *fzd4*^{-/-} versus *fzd4*^{+/+}

Quantification de la densité vasculaire du cœur et du rein *fzd4*^{-/-} versus *fzd4*^{+/+} par analyse du pourcentage de la densité du marquage CD31 et αSMA par unité de volume du tissu (Vv).

*, p<0.05 ; ****, p<0.001

Ce défaut d'artérialisation dans le cœur et les reins des souris *fzd4*^{-/-} s'accompagne de la diminution du marqueur artériel EphrinB2 tant au niveau transcriptionnel qu'au niveau protéique. En effet, des analyses par PCR quantitative montrent une diminution significative du marqueur artériel *ephrinB2*, de 0.37±0.24 et de 0.35±0.2 fois, respectivement dans le cœur et les reins des souris *fzd4*^{-/-} versus *fzd4*^{+/+} (**Figure 47A**), et des analyses par Western Blot confirment la diminution significative de l'expression protéique d'EphrinB2 (**Figure 47B**). Ces résultats mettent donc en évidence un phénotype artériel induit par la perte du gène *fzd4* et suggèrent un rôle de Fzd4 dans la régulation de la morphogénèse artérielle chez la souris.

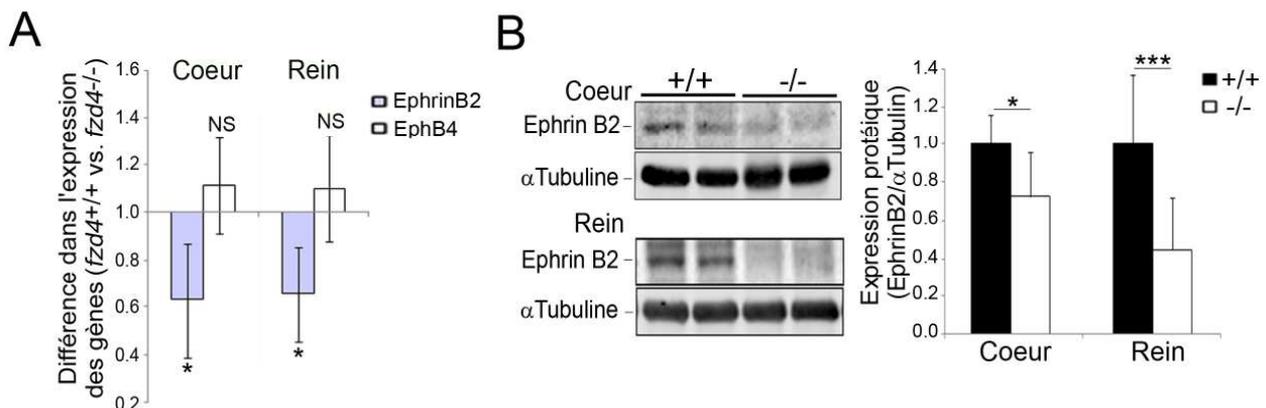


Figure 47: Effet de la délétion de *fzd4* sur l'expression transcriptionnelle et protéique d'EphrinB2 dans le cœur et les reins nouveaux-nés

Analyse transcriptionnelle par qPCR (n=4) (A) et protéique par Western Blot (n=3) (B) du taux d'EphrinB2 dans le cœur et les reins de souris *fzd4*^{-/-} versus *fzd4*^{+/+}.

Par microCT, nous avons montré que les petites artères du cœur et des reins, et non les grosses artères principales, sont touchées par la perte de *fzd4*. Nous avons donc voulu analyser une artère de plus gros calibre, la carotide, afin de voir si la délétion de *fzd4* altère la structure des plus gros vaisseaux. C'est pourquoi une analyse morphométrique de la carotide a été réalisée sur les souris sauvages et *fzd4*^{-/-}. Aucune modification structurale de la carotide de souris *fzd4*^{-/-} n'a été décelée où l'on observe un diamètre, un nombre de CML dans la paroi vasculaire et un pourcentage d'élastine et de collagène comparables à ceux observés dans les souris *fzd4*^{+/+} (**Tableau 15**). A partir de ces résultats, nous pouvons en conclure que *fzd4* est nécessaire à la formation des petits capillaires, mais pas des gros vaisseaux.

	Frizzled4 +/+	Frizzled4 +/-	Frizzled4 -/-	p Value
Carotide				
Elastine (%)	43 ± 3	47 ± 2	47 ± 2	NS
Collagène (%)	26 ± 4	31 ± 2	31 ± 2	NS
Nombre de noyau	92 ± 8	88 ± 9	75 ± 3	NS
Epaisseur (µm)	21 ± 2	20 ± 1	20 ± 2	NS
Section médiale (µm / 10 ³)	21.1 ± 0.6	20.4 ± 2.0	17.7 ± 0.9	NS
Diamètre à pression artérielle moyenne	0.51 ± 0.02	0.56 ± 0.02	0.48 ± 0.02	NS

Tableau 15: Effet de la délétion de *fzd4* sur la structure d'une artère de gros calibre, la carotide

Analyse morphométrique de la carotide de souris *fzd4*^{-/-} versus *fzd4*^{+/+}.

NS, Non significatif

c) Effet de la délétion de *fzd4* sur la densité vasculaire et l'organisation des vaisseaux

La réduction de la densité vasculaire dans les mutants *fzd4* pourrait s'expliquer par une diminution de la stabilité vasculaire. Pour répondre à cette hypothèse, nous avons analysé le réseau vasculaire des reins *fzd4*^{-/-} versus *fzd4*^{+/+}. En effet, parmi les différents organes analysés par microCT, les reins semblent être les organes les plus touchés par la perte de *fzd4*. Le phénotype des microvaisseaux artériels est plus drastique et la diminution du marqueur artériel EphrinB2 au niveau protéique est plus importante.

Comme les cellules murales jouent un rôle dans la stabilité vasculaire, nous avons analysé les CML du réseau vasculaire rénal de souris à J5 et à l'âge adulte, en réalisant un marquage des CE et des CML avec les anticorps dirigés respectivement contre CD31 et αSMA (**Figure 48**). A J5, nous observons un réseau capillaire dense révélé par un marquage CD31 dans les reins de souris sauvages, alors que les reins des souris *fzd4*^{-/-} présentent une diminution du nombre

de CE CD31-positives, montrant une perte de la formation capillaire. De manière intéressante, nous observons également que dans les souris sauvages à J5, les capillaires sont largement recouverts par l' α SMA, alors que dans les souris *fzd4*^{-/-}, les CML apparaissent plus dispersées, et ne sont plus enroulées autour des CE (**Figure 48**).

Dans les reins de souris sauvages adultes, les capillaires sont bien organisés, formant des structures en nid d'abeilles. En absence de Fzd4, les analyses confocales révèlent que le squelette de l'organisation vasculaire est maintenu, mais avec un réseau de microcapillaires pauvre. Il est intéressant aussi de noter que le retard de recouvrement des capillaires par les CML à J5 est partiellement retrouvé chez l'adulte (**Figure 48**).

Ces résultats indiquent donc que la perte de *fzd4* contrôle la formation capillaire et ralentit le recouvrement des capillaires par les CML, comme si elle induisait un retard de musculation des vaisseaux ; retard qui est cependant rattrapé à l'âge adulte.

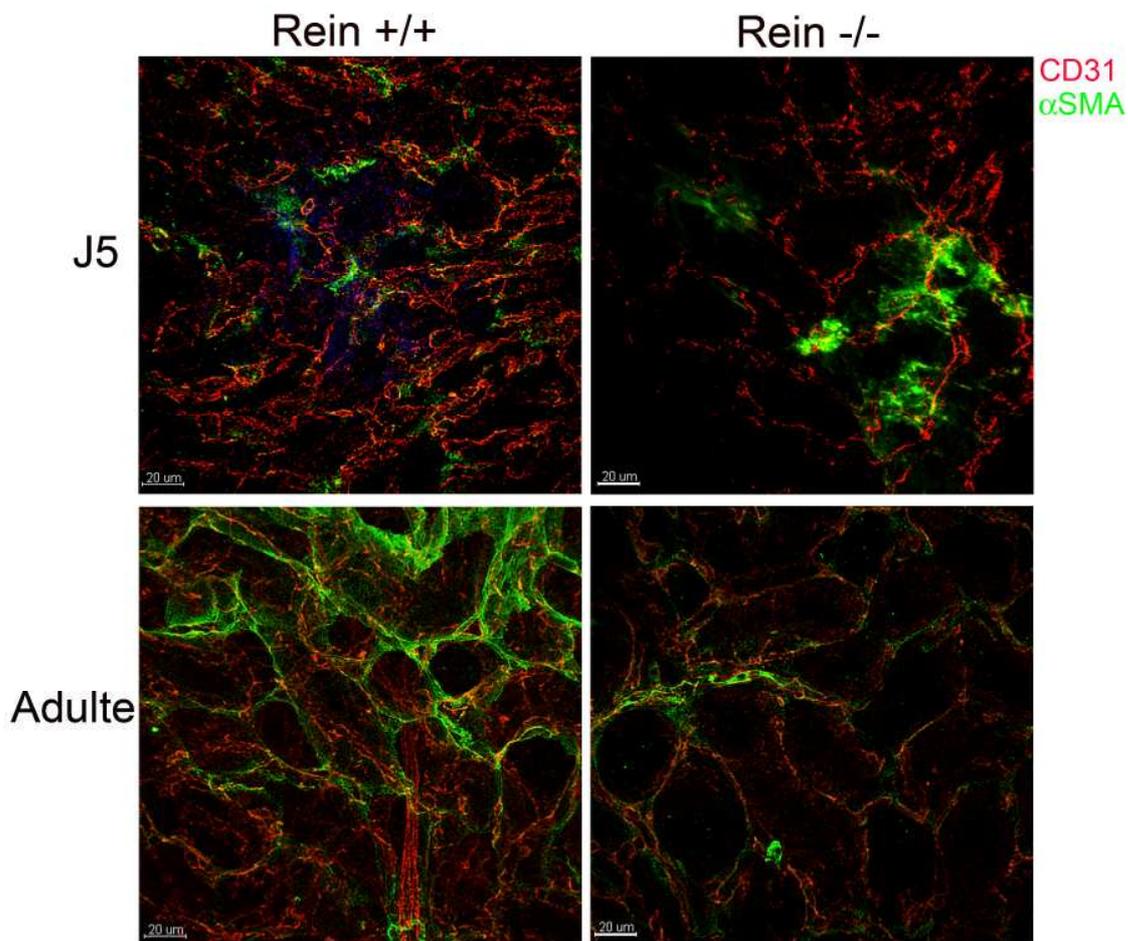


Figure 48: Effet de la délétion de *fzd4* sur la formation et la structure des capillaires du rein

Analyse confocale du réseau vasculaire (marquage CD31 et α SMA) du rein de souris *fzd4*^{-/-} versus *fzd4*^{+/+} à J5 et à l'âge adulte.

d) Effet de la délétion de *fzd4* sur les fonctions cardiaque et rénale

Suite à ces résultats, les paramètres hémodynamiques cardiaques et rénaux ont été mesurés afin de voir si le phénotype vasculaire observé sur ces organes avait un effet sur leurs fonctions.

(1) Effet de la délétion de *fzd4* sur la fonction cardiaque

Malgré les anomalies morphologiques du réseau coronarien, on n'observe pas de différence significative dans le rapport Poids du cœur/Poids total entre les souris *fzd4*^{-/-} versus *fzd4*^{+/+} adultes. De plus, la fonction cardiaque diastolique n'est pas altérée chez les animaux *fzd4*^{-/-} (**Tableau 16**). En effet, les paramètres de contraction (dP/dt (+)) et de relaxation (Tau et dP/dt (-)) sont similaires entre les souris sauvages et *fzd4*^{-/-}. L'injection d'un inotrope positif, la dobutamine, ne permet pas de démasquer de différences dans ces paramètres.

	Frizzled4 +/+	Frizzled4 -/-
Fonction cardiaque	n=5	n=6
Poids total de la souris (g)	26,0 ± 1.5	17.2 ± 1.5***
Poids du coeur (g)	0.26 ± 0.04	0.17 ± 0.01*
Ratio (Poids du coeur/Poids total) (%)	1 ± 2	0,98 ± 0,6
Tau (ms)	14.2 ± 3.0	13.3 ± 5.9
dP/dt (+) (mmHg/s)	4141 ± 340	3955 ± 367
dP/dt (-) (mmHg/s)	-3141 ± 402	-3618 ± 239
dP/dt (+) avec dobutamine (mmHg/s)	6024 ± 603	6059 ± 562
dP/dt (-) avec dobutamine (mmHg/s)	-4236 ± 594	-4688 ± 282

Tableau 16: Effet de la délétion de *fzd4* sur les paramètres cardiaques des souris *fzd4*^{-/-} versus *fzd4*^{+/+}

Mesure des paramètres de contraction dP/dt (+) et de relaxation Tau et dP/dt (-) avec ou sans dobutamine chez les souris *fzd4*^{-/-} versus *fzd4*^{+/+}.

*, p<0.05 ; ***, p<0.001

(2) Effet de la délétion de *fzd4* sur la fonction rénale

De même, malgré un réseau artériel rénal incomplet, le rapport Poids du rein/Poids total reste semblable entre les souris *fzd4*^{-/-} versus *fzd4*^{+/+} adultes et la fonction homéostatique rénale ne semble pas être altérée. En effet, les données brutes du sang et du plasma semblent normales chez les souris *fzd4*^{-/-} comparées aux souris sauvages (**Tableau 17**). De plus, certains paramètres rénaux dont la clearance de la créatinine, le taux de rénine plasmatique par dosage d'angiotensinogène I et le taux d'excrétion d'aldostérone ont été mesurés, et semblent en globalité être similaires entre les souris sauvages et *fzd4*^{-/-} (**Tableau 17**).

	Frizzled4 +/+	Frizzled4 -/-
Fonction rénale	n=10	n=10
Poids total de la souris (g)	26,1 ± 1.5	17.7 ± 1.3***
Poids du rein (g)	0.25 ± 0.02	0.16 ± 0.02*
Ratio (Poids du rein/Poids total) (%)	0.95 ± 1.3	0.90 ± 1.5
Sang		
pH	7,37 ± 0,03	7,35 ± 0,02
pCO ₂ (mmHg)	44,0 ± 3,2	50,5 ± 3,4**
pO ₂ (mmHg)	66,0 ± 14,2	63,5 ± 34,3
sO ₂ (%)	90,9 ± 3,6	85,3 ± 6,8
Hémoglobine (g/dl)	14,3 ± 0,8	14,0 ± 0,7
Plasma		
Na ⁺ (mmol/l)	146 ± 0.9	150 ± 7.7
K ⁺ (mmol/l)	4.8 ± 0.8	4.7 ± 0.3
Cl ⁻ (mmol/l)	114 ± 1.4	114 ± 2.6
HCO ₃ ⁻ (mmol/l)	25.0 ± 1.8	27.7 ± 1.7*
Calcium total (mmol/l)	1.25 ± 0.03	1.26 ± 0.04
Créatinine (µmol/jour)	3,60 ± 1,1	1,94 ± 1,1*
Clearance (µl/min/g)	13,97 ± 3,4	14,77 ± 5,5
Rénine (/µg Ang I formée/ml/h)	11,7 ± 5,5	15,7 ± 10,2
Excretion d'aldostérone (/jour/g)	599 ± 157	913 ± 656

Tableau 17: Effet de la délétion de *fzd4* sur les paramètres rénaux des souris *fzd4*^{-/-} versus *fzd4*^{+/+}

Mesure de certains paramètres rénaux tels que les données brutes du sang et du plasma, ainsi que la clearance de la créatinine, le taux de rénine plasmatique par dosage d'angiotensinogène I et le taux d'excrétion d'aldostérone chez les souris *fzd4*^{-/-} versus *fzd4*^{+/+}.

*, p<0.05 ; **, p<0.005 ; ***, p<0.001

Ces résultats suggèrent que la délétion de *fzd4* réduit dramatiquement la formation du réseau artériel du cœur et des reins, mais n'engendre pas de défauts fonctionnels de ces organes.

e) Effet de la délétion de *fzd4* sur les paramètres vasculaires

De par le phénotype artériel observé dans certains organes de souris *fzd4*^{-/-}, nous avons également exploré la fonction de larges (artère de compliance) et de petites (artère de résistance) artères.

(1) Analyse des propriétés mécaniques d'une grosse artère, la carotide

Nous avons analysé les propriétés mécaniques de la carotide, une grosse artère élastique qui ne présentent pas de défauts structuraux (**Tableau 15**), en réponse à des stimuli mécaniques. Tout d'abord, la pression artérielle moyenne reste la même chez les souris *fzd4*^{-/-} versus *fzd4*^{+/+}. On observe que les mesures de la compliance, de la distensibilité et de l'élasticité artérielle à pression moyenne en réponse à des incréments de forces élastiques ne sont pas affectées chez les souris *fzd4*^{-/-} (**Tableau 18**). La délétion de *fzd4* n'a donc pas d'effet sur les fonctions hémodynamiques des grosses artères telles que la carotide.

	Frizzled4 +/+	Frizzled4 +/-	Frizzled4 -/-
Poids total de la souris (g)	31 ± 2	34 ± 2	22 ± 1*
Pression artérielle (queue)	125 ± 1	118 ± 6	122 ± 5
Fréquence cardiaque (bpm)	643 ± 23	646 ± 23	666 ± 20
Carotide			
Compliance à pression artérielle moyenne	2.1 ± 0.3	1.7 ± 0.3	1.4 ± 0.2
Distensibilité de la coupe artérielle à pression artérielle moyenne	10.1 ± 1.2	7.2 ± 1.3	7.9 ± 0.7
Module d'élasticité (E _{inc})	459 ± 81	925 ± 186	616 ± 92

Tableau 18: Effet de la délétion de *fzd4* sur la fonction d'une artère de gros calibre, la carotide

Analyse mécanique de la carotide de souris *fzd4*^{-/-} versus *fzd4*^{+/+} par mesure de la compliance, de la distensibilité et de l'élasticité à pression moyenne en réponse à des incréments de forces élastiques.

*, p<0.05

(2) Analyse de la réactivité artérielle de petites artères

Nous avons ensuite analysé le rôle de Fzd4 sur le tonus vasculaire de plus petites artères, dites de résistance, les artères cérébrales et mésentériques, isolées à partir de souris *fzd4^{-/-}* et *fzd4^{+/+}*. Nous avons tout d'abord analysé la réactivité de ces artères en réponse à des molécules pharmacologiques impliquées dans la contraction et la dilatation des vaisseaux. Nous observons que la contraction au chlorure de potassium (KCl), à la sérotonine (5HT) ou à la phényléphrine (PE), et la vasodilatation à l'acétylcholine (Ach) ne sont pas du tout altérées (**Figure 49**). La réactivité de ces artères à ces agents pharmacologiques n'est donc pas touchée par la perte de *fzd4*.

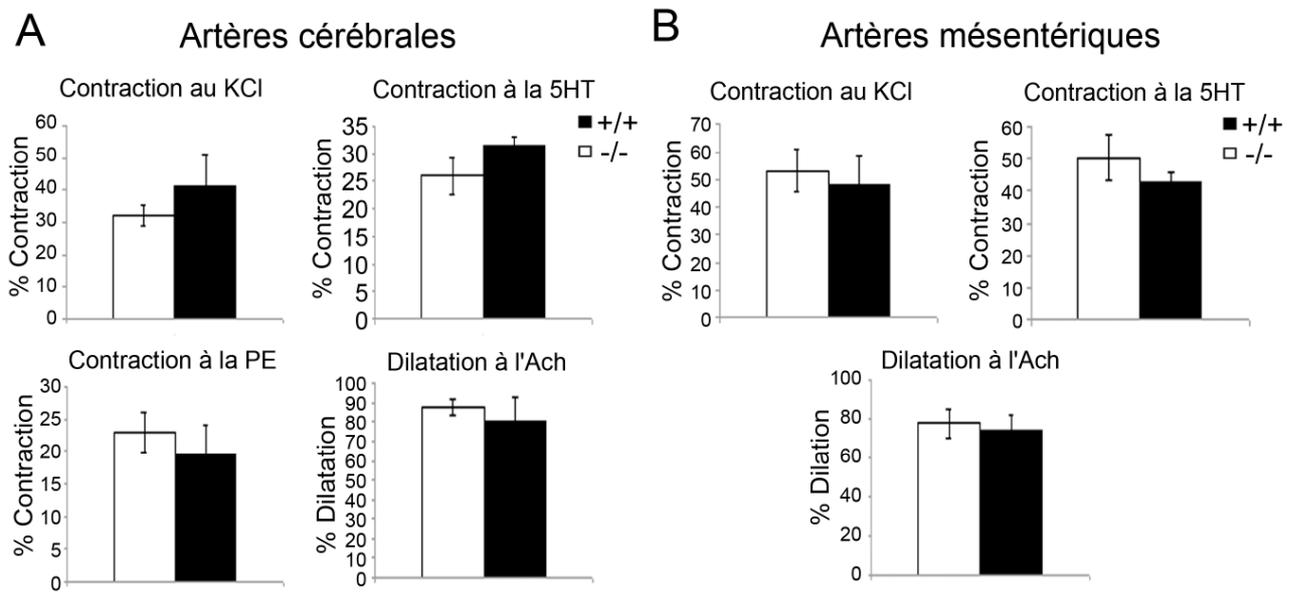


Figure 49: Effet de la délétion de *fzd4* sur la vasoréactivité des petites artères en réponse à des agents pharmacologiques

Mesure de la contraction ou de la relaxation des petites artères cérébrales (A) et mésentériques (B) de souris *fzd4^{-/-}* versus *fzd4^{+/+}* en réponse au chlorure de potassium (KCl), à la sérotonine (5HT), à la phényléphrine (PE) et à l'acétylcholine (Ach).

L'écoulement du sang dans les vaisseaux induit des fluctuations de la pression sanguine et du flux sanguin qui créent diverses forces comme les forces d'étirement et les forces de cisaillement auxquelles les petites et les moyennes artères s'adaptent. Cette adaptation met en jeu des mécanismes de vasodilatation et de vasoconstriction afin de réguler la fluctuation de ces paramètres. La vasomotricité est donc une propriété qu'ont les vaisseaux sanguins, qui changent ainsi de diamètre en fonction des modifications du milieu intérieur (Bevan et al. 1991; Loufrani et al. 2008).

Cette vasomotricité a été étudiée sur ces artères de petit calibre. Nous avons observé que la contraction des artères cérébrales et mésentériques en réponse à une augmentation de la pression est similaire chez les souris sauvages et *fzd4*^{-/-}. Le tonus myogénique correspondant à la propriété intrinsèque du muscle lisse à se contracter en réponse à un étirement n'est donc pas affecté par la perte du gène *fzd4* (**Figure 50**). De plus, le diamètre passif des artères, qui augmente suite à l'élévation de pression, reste le même pour les deux types de souris.

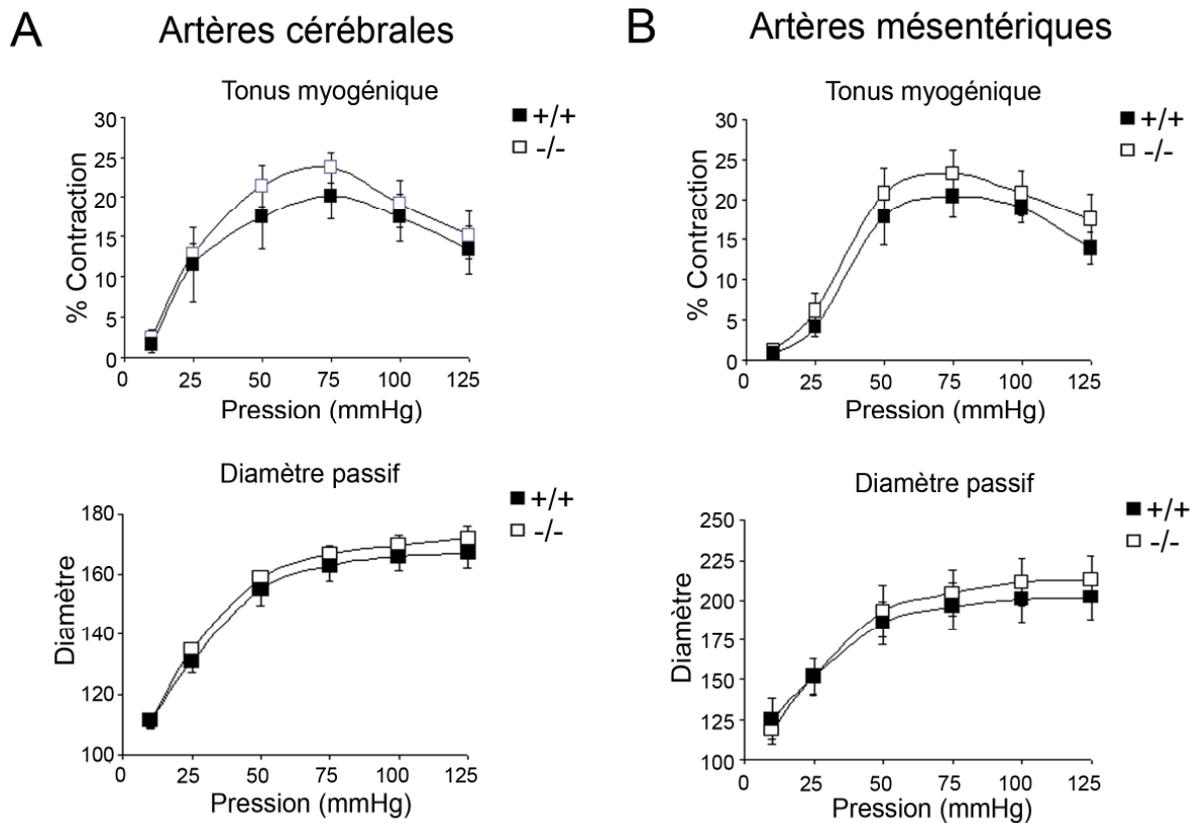


Figure 50: Effet de la délétion de *fzd4* sur la contraction des petites artères en réponse à la pression

Mesure du tonus myogénique et du diamètre passif des petites artères cérébrales (A) et mésentériques (B) de souris *fzd4*^{-/-} versus *fzd4*^{+/+} en réponse à une augmentation de pression.

En revanche, la mesure des paramètres hémodynamiques vasculaires des petites artères mésentériques et cérébrales a mis en évidence une perte de leur réponse au flux, et donc aux forces de cisaillement (ou « shear stress »). En effet, l'augmentation du flux induit une vasodilatation des artères sauvages, vasodilatation qui est fortement altérée pour les artères de souris *fzd4*^{-/-} (Figure 51).

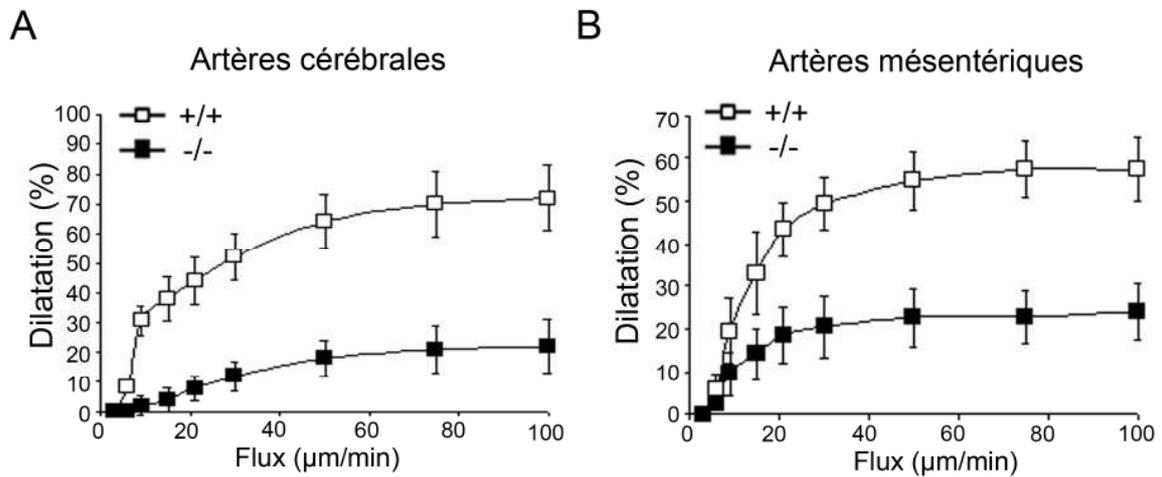


Figure 51: Effet de la délétion de *fzd4* sur la vasodilatation des petites artères en réponse au flux

Mesure de la vasodilatation des petites artères cérébrales (A) et mésentériques (B) de souris *fzd4*^{-/-} versus *fzd4*^{+/+} en réponse à une augmentation de flux.

La réactivité des petites artères *fzd4*^{-/-} est donc altérée au niveau de sa réponse vasodilatatrice aux forces de cisaillement, suggérant un nouveau et important rôle spécifique des récepteurs Fzd4 dans le contrôle de la dilatation des artères en réponse à une augmentation du flux.

2. Analyse *in vitro* du rôle de Fzd4 sur les propriétés fonctionnelles des cellules vasculaires

La réduction de la formation des ramifications vasculaires observée dans le cœur et les reins *fzd4*^{-/-} émettent l'hypothèse que la perte de *fzd4* a un effet sur les propriétés des cellules vasculaires. Pour garder les propriétés intrinsèques et propres des cellules vasculaires délétées de *fzd4*, nous avons isolé *in vitro* des cellules vasculaires primaires (cellules endothéliales rénales et cellules musculaires lisses aortiques primaires) provenant de souris *fzd4*^{+/+} et *fzd4*^{-/-}. Nous avons tout d'abord vérifié l'expression transcriptionnelle de *fzd4* dans ces cellules, et observons que Fzd4 est aussi bien exprimé dans les CML que dans les CE (**Figure 52**).

Nous avons également isolé des fibroblastes embryonnaires (MEF) à partir de souris *fzd4*^{-/-} vs *fzd4*^{+/+}. En effet, les MEF sont des cellules qui représentent un modèle cellulaire *ex vivo* très utilisé pour l'étude fonctionnelle des cellules ; l'utilisation de ces cellules représentent donc un bon outil de contrôle dans cette étude. Cependant, malgré leur origine embryonnaire, leur potentiel de différenciation est peu connu, mise à part leur capacité à se différencier en adipocytes (Alexander et al. 1998) ou en chondrocytes (Lengner et al. 2004). Dans cette étude, nous avons vérifié que *fzd4* est bien exprimé dans ces cellules, et que le taux d'ARNm est comparable avec celui observé pour les CML et les CE (**Figure 52**).

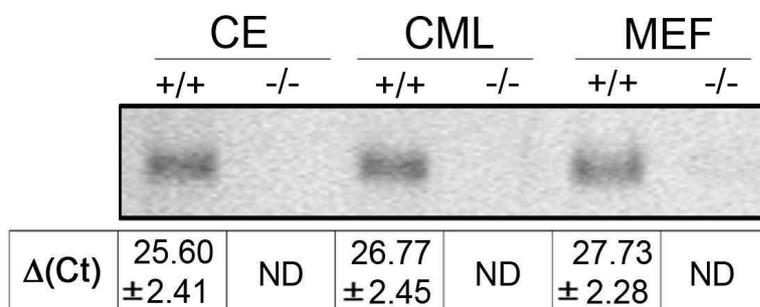


Figure 52: Expression transcriptionnelle de *fzd4* dans les CE, CML et MEF de souris *fzd4*^{-/-} versus *fzd4*^{+/+}

Analyse par PCR en temps réel de l'expression de *fzd4*, où ΔCt correspond au nombre de cycles d'amplification rapporté à un gène standard (n= 6).

Afin de voir quelles fonctions cellulaires Fzd4 régule, différentes fonctions impliquées dans l'angiogenèse telles que la prolifération, la différenciation, la migration et la polarisation des cellules vasculaires ont été analysées par des tests *in vitro* sur ces cellules primaires isolées, ainsi que sur une lignée cellulaire.

a) Rôle de Fzd4 sur la prolifération des cellules vasculaires

L'analyse de la prolifération cellulaire a montré que les CE *fzd4*^{-/-} prolifèrent moins que les CE *fzd4*^{+/+}. En effet, à 24 h, ces cellules présentent moins d'incorporation du BrdU, et le taux de cellules ayant incorporé le BrdU sur le nombre de cellules totales est réduit pour les CE *fzd4*^{-/-} (**Figure 53A**). Il semble donc que la délétion du gène *fzd4* empêche la prolifération des CE.

Cet effet a été confirmé par comptage cellulaire sur une lignée de cellules endothéliales microvasculaires, HMEC-1. L'extinction du gène *fzd4* par la méthode d'ARN interférence (*fzd4*KD) induit une baisse du nombre de HMEC-1 à 48 h et à 72 h (**Figure 53B**).

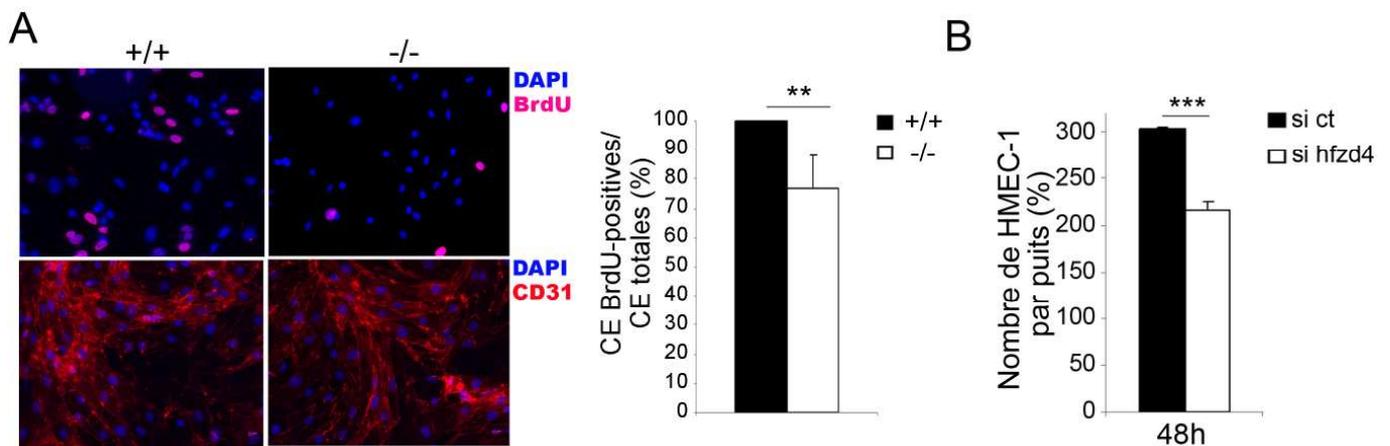


Figure 53: Effet de la délétion de *fzd4* sur la prolifération des CE

Analyse de la prolifération des CE primaires par le test d'incorporation du BrdU dans les cellules (n=4) (A) et de la prolifération des HMEC-1 par comptage cellulaire après extinction du gène *hfzd4* par ARN interférence (n=3) (B).

** , p<0.005 ; *** , p<0.001

Une étude par cytométrie en flux a également été menée sur les HMEC-1 *fzd4*KD synchronisées dans le cycle par déprivation de sérum. Nous avons observé à différents temps après réactivation du cycle par le sérum le pourcentage de cellules qui se trouvent en phase G1 et en phase S, et avons comparé ces pourcentages entre les HMEC-1 contrôles et *fzd4*KD. Nous constatons que l'extinction du gène *fzd4* entraîne un retard de l'entrée des CE dans la transition G1 à S du cycle puisque le pourcentage de CE *fzd4*KD en phase S est plus faible que celui des CE contrôles à 12h et 16 h (**Tableau 17**). Un pourcentage des CE *fzd4*KD reste en phase G1. Le cycle cellulaire est donc ralenti par la perte de *fzd4*, montrant que Fzd4 régule la prolifération des cellules endothéliales.

HMEC-1	0 h		8 h		12 h		16 h	
	Si ct	Si hfzd4						
G1	71.94	68.56	68.16	71.3	61.48	66.2	53.93	58.01
S	8.73	11.29	12.44	12.11	17.48	13.12	25.5	19.57
G2M	12.12	11.96	11.93	9.31	10.28	12.94	8.84	12.99

Tableau 17: Effet de la délétion de *fzd4* sur le cycle des cellules HMEC-1

Analyse du pourcentage de HMEC-1 en phase S, G1 et G2M après extinction du gène *hfzd4* par ARN interférence. Le pourcentage a été calculé à différents temps après la resynchronisation des HMEC-1 en phase G0.

Aucun effet de Fzd4 n'est observé sur la prolifération des CML bien qu'il en ait un sur la prolifération des CE. Le nombre de CML primaires *fzd4*^{+/+} et *fzd4*^{-/-} reste semblable à 20 h, 64 h et 96 h (**Figure 54A**).

En revanche, le comptage cellulaire des MEF a lui, mis en évidence un effet de Fzd4 sur la prolifération des MEF puisqu'à 48 h et à 72 h, le nombre de MEF *fzd4*^{-/-} est fortement réduit. Ce résultat est d'ailleurs confirmé par extinction du gène *fzd4* par ARN interférence sur les MEF sauvages (**Figure 54B**).

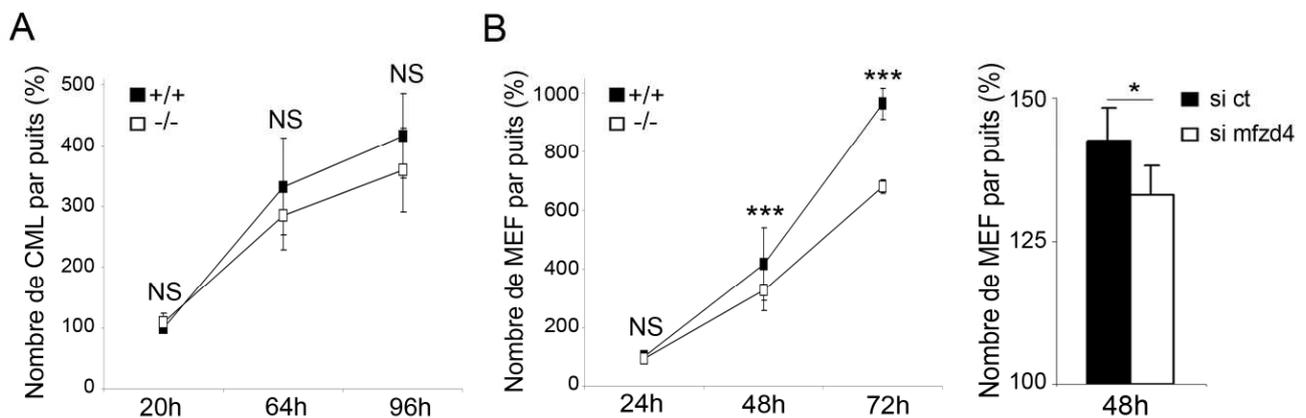


Figure 54: Effet de la délétion de *fzd4* sur la prolifération des CML et des MEF

Analyse de la prolifération des CML (n=4) (A) et des MEF (n=2) (B) primaires par comptage cellulaire, ainsi que la prolifération de MEF *fzd4*^{+/+} après extinction du gène *mfzd4* par ARN interférence (n=2) (B).

NS, non significatif ; *, p<0.05 ; ***, p<0.001

Ces résultats ont donc montré une diminution de la prolifération cellulaire spécifiquement pour les MEF et pour les CE primaires *fzd4*^{-/-} ; la prolifération des CML ne semble pas être touchée. Au niveau vasculaire, Fzd4 régulerait cette fonction cellulaire spécifiquement dans les CE.

b) Rôle de Fzd4 sur la migration et la polarisation des cellules vasculaires

(1) Effet de la délétion de *fzd4* sur la migration des cellules vasculaires

Nous avons également analysé l'effet de Fzd4 sur la migration des cellules vasculaires en réponse aux facteurs de croissance, qui est un important processus cellulaire lors du déroulement de l'angiogenèse.

Par un test de chimiotactisme dans des chambres de culture Transwell, nous constatons que les CE *fzd4*^{-/-} migrent moins à travers les chambres sous l'effet du sérum à 10%, mais aussi sous l'effet du VEGF-A et du bFGF, deux facteurs de croissance impliqués dans la migration des cellules lors de l'angiogenèse (**Figure 55**). Fzd4 serait donc impliqué dans la régulation de la migration des CE, sous des stimuli indistincts.

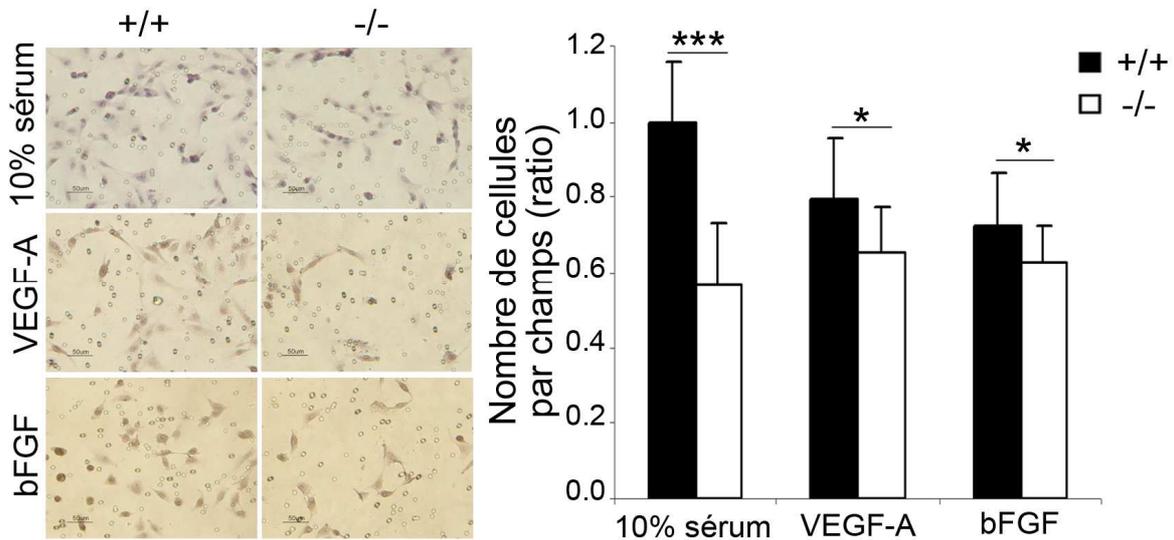


Figure 55: Effet de la délétion de *fzd4* sur la migration des CE

Analyse de la migration par chimiotactisme des CE primaires dans un modèle de chambre de culture Transwell en réponse à divers stimuli : 10% de sérum, VEGF-A et bFGF, pendant 16 h. L'histogramme représente le nombre de cellules par champs rapporté à celui des cellules *fzd4*^{+/+} (n=4).

*, p<0.05 ; ***, p<0.001

Nous avons ensuite regardé si cette fonction était altérée dans les CML et les MEF, et ce, en réponse au bFGF qui est un facteur de croissance fortement impliqué dans le branching des vaisseaux. Dans le test de migration sur strie, en réponse au bFGF, les CML primaires *fzd4*^{-/-} ne migrent pratiquement pas dans la strie au bout de 20 h, alors que les CML *fzd4*^{+/+} ont déjà migré jusqu'au milieu de la strie (**Figure 56**). Les CML ne semblent donc pas répondre aux signaux migratoires du bFGF suite à la délétion du gène *fzd4*.

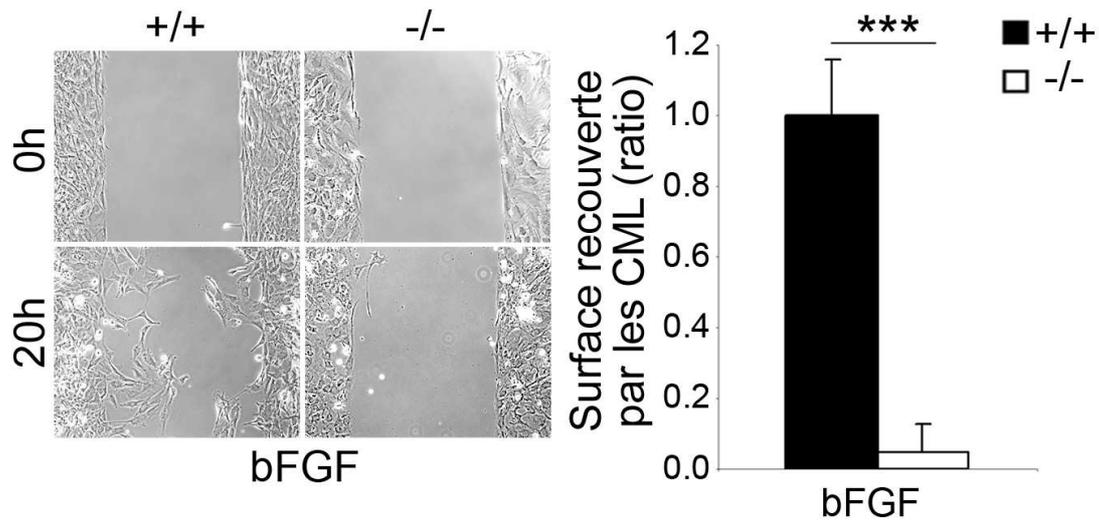


Figure 56: Effet de la délétion de *fzd4* sur la migration des CML

Analyse de la migration sur strie des CML primaires en réponse au bFGF. L'histogramme représente la surface recouverte par les CML après 20 h de migration rapporté à celle des cellules *fzd4*^{+/+} (n=2).

***, p<0.001

Cet effet est également observé pour les MEF. Dans ce même test de migration sur strie, la réponse migratoire des MEF *fzd4*^{-/-} au bFGF est fortement inhibée (**Figure 57A**).

D'autres tests de migration ont été réalisés sur les MEF, afin de conforter ces résultats. La migration induite par le bFGF dans un modèle de chimiotactisme est également altérée dans les MEF *fzd4*^{-/-} (**Figure 57B**).

Pour tester l'effet de la délétion de *fzd4* sur le mouvement cellulaire, une analyse de la vitesse des MEF par vidéomicroscopie a été ajoutée à ces tests pour laquelle on a quantifié la distance parcourue par les cellules sur 15 h (**Figure 57C**). On observe qu'en condition contrôle, les cellules *fzd4*^{+/+} et *fzd4*^{-/-} migrent sur une même distance en 15 h. Sous l'action du bFGF, dans un même laps de temps, la distance parcourue par les MEF sauvages est augmentée. En revanche, la perte de *fzd4* altère fortement le déplacement des MEF sous l'effet du bFGF puisque la distance parcourue pour ces cellules reste la même en condition contrôle et bFGF.

Ces résultats suggèrent que la vélocité des cellules délétées pour *fzd4* diminue sous le bFGF, expliquant la perte de la réponse migratoire observée pour les cellules vasculaires en réponse à ce facteur de croissance.

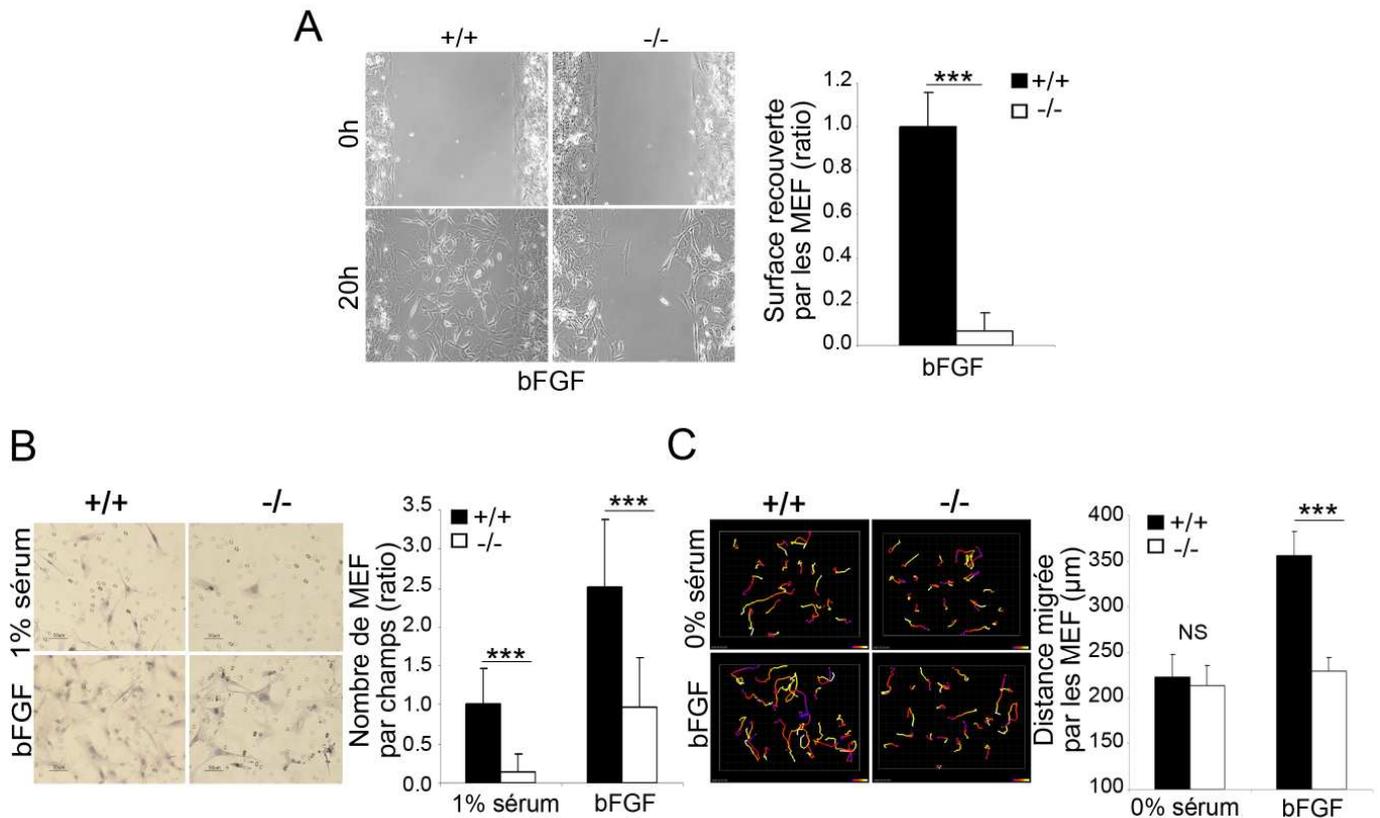


Figure 57: Effet de la délétion de *fzd4* sur la migration des MEF

(A) Analyse de la migration sur strie des MEF en réponse au bFGF. L'histogramme représente la surface recouverte par les CML après 20 h de migration rapporté à celle des cellules *fzd4*^{+/+} (n=2)

(B) Analyse de la migration par chimiotactisme des MEF dans un modèle de chambre de culture Transwell en réponse au bFGF, pendant 16 h. L'histogramme représente le nombre de cellules par champs rapporté à celui des cellules *fzd4*^{+/+} (n=5)

(C) Analyse du mouvement des MEF en réponse au bFGF suivi par vidéomicroscopie. L'histogramme représente la distance parcourue en µm par les MEF *fzd4*^{+/+} et *fzd4*^{-/-} pendant 15 h (n=3).

***, p<0.001

(2) Effet de la délétion de *fzd4* sur la polarisation des cellules vasculaires

Pour comprendre cette altération de la migration des cellules vasculaires en réponse au bFGF, nous avons étudié la polarisation des cellules qui est un événement indispensable au processus de migration. Cette polarisation cellulaire se traduit notamment par une relocalisation du Golgi en avant du noyau (Nobes et al. 1999). En effet, lorsque les cellules migrent, elles

présentent en avant du noyau un Golgi assemblé en une structure dense et compacte. Nous avons donc analysé la relocalisation du Golgi par marquage du Golgi dans les 3 types de cellules primaires, dans un modèle où les cellules migrent dans une strie, en direction du stimulus, le bFGF. Ce test de polarisation cellulaire est basé sur la quantification de ces changements morphologiques cellulaires, en calculant l'organisation et le volume du Golgi dans les cellules.

Tout d'abord, le profil de répartition du Golgi de part et d'autre du noyau de la cellule en migration a été étudié pour analyser l'organisation du Golgi. Ce profil représente l'intensité du fluorochrome rouge (Golgi) et du fluorochrome bleu (noyau) mesurée le long de la cellule. Dans les 3 types de cellules, on observe qu'en arrière du noyau, le profil de l'intensité du Golgi est semblable pour les cellules *fzd4*^{+/+} et *fzd4*^{-/-}, alors qu'en avant du noyau, ces profils sont différents avec un aplatissement de la courbe correspondant à celle des cellules *fzd4*^{-/-} (**Figure 58**). Cette différence de profil en avant du noyau suggère que le Golgi n'est pas totalement concentré en avant du noyau dans les cellules mutées pour *fzd4*, comme il l'est dans les cellules *fzd4*^{+/+}. Cette relocalisation partielle du Golgi dans les cellules *fzd4*^{-/-} traduirait une altération de la polarisation des cellules en migration en réponse au bFGF.

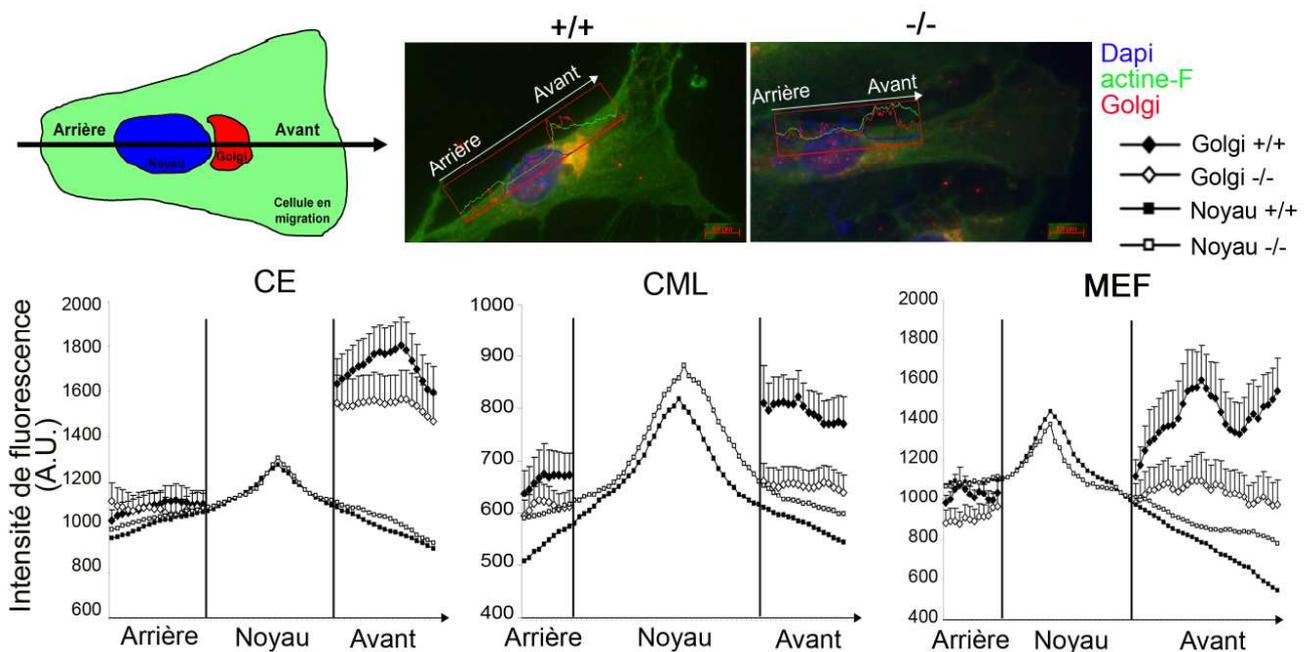


Figure 58: Effet de la délétion de *fzd4* sur la polarisation des CE, des CML et des MEF en migration

L'analyse de la polarisation des cellules est réalisée par un marquage du Golgi (rouge) et du noyau (DAPI, bleu). Dans un modèle de migration sur strie, sous l'action du bFGF, le profil sur lequel se répartit le Golgi dans la cellule en migration est étudié en traçant une ligne le long de la cellule, passant par le noyau et dans le sens de la migration. Le profil d'intensité exprimé en unité arbitraire (A.U.) de chaque fluorochrome est mesuré le long de la ligne et est représenté dans les graphes pour chaque type de cellules vasculaires *fzd4*^{+/+} et *fzd4*^{-/-}.

A partir du marquage du Golgi et du noyau de ces cellules vasculaires, une deuxième analyse a été réalisée afin de conforter ce résultat. A l'aide du logiciel Imaris software (Bitplane), le volume dans lequel se répartit le Golgi a été reconstruit afin de mesurer ce volume et de le comparer entre les cellules $fzd4^{+/+}$ et $fzd4^{-/-}$. On a pu constater que pour les 3 types de cellules, le volume du Golgi est plus important dans les cellules $fzd4^{-/-}$ (**Figure 59**). Cette augmentation de volume traduit une répartition plus éparse du Golgi en avant du noyau pour les cellules $fzd4^{-/-}$, et au contraire, un volume plus concentré et donc plus petit pour les cellules $fzd4^{+/+}$. Ce résultat confirme que les cellules $fzd4^{-/-}$ présentent une altération de la relocalisation du Golgi en avant du noyau, et donc une altération de leur polarisation lorsqu'elles migrent sous l'action du bFGF.

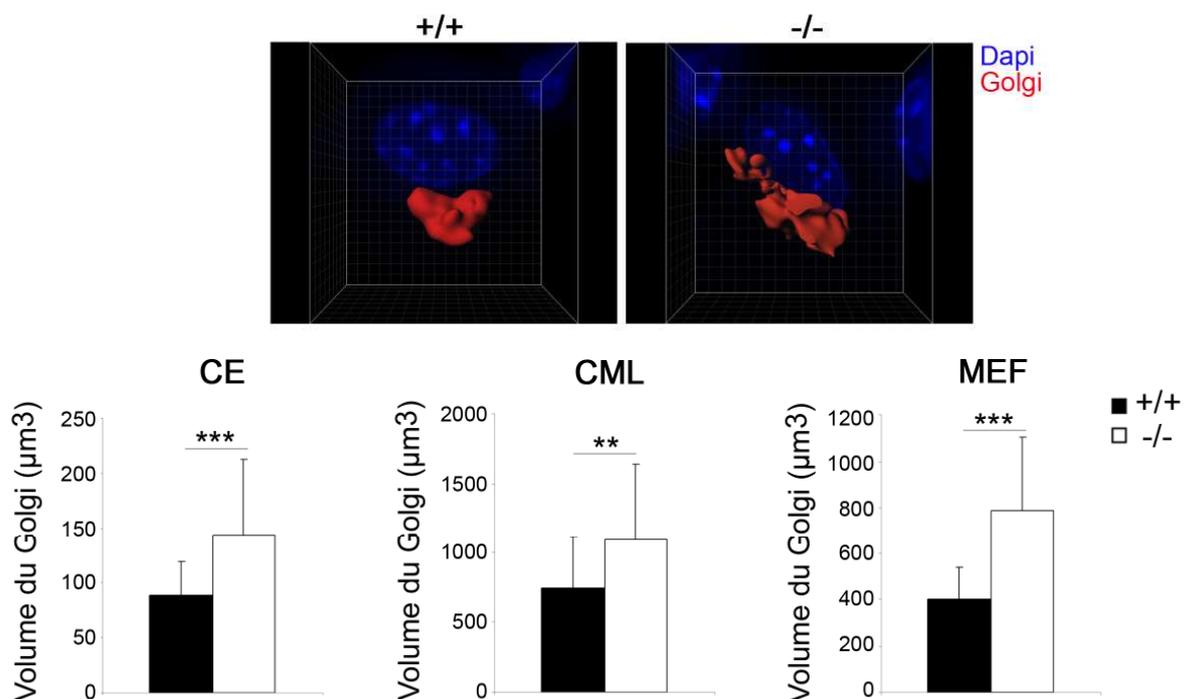


Figure 59: Effet de la délétion de $fzd4$ sur la polarisation des CE, des CML et des MEF en migration

L'analyse de la polarisation des cellules est réalisée par un marquage du Golgi (rouge) et du noyau (DAPI, bleu). Dans un modèle de migration sur strie, sous l'action du bFGF, le volume du Golgi des cellules en migration est mesuré après reconstruction par le logiciel Imaris software Surpass (Bitplane) et est représenté dans les histogrammes pour chaque type de cellules vasculaires $fzd4^{+/+}$ et $fzd4^{-/-}$.

, $p < 0.005$; *, $p < 0.001$

L'inhibition de la migration des cellules vasculaires en réponse au bFGF serait donc associée à une altération de l'organisation du Golgi, et donc à un défaut de la polarisation des cellules.

c) Rôle de Fzd4 sur la différenciation des cellules endothéliales

Comme nous l'avons vu *in vivo*, le réseau de ramifications artérielles est dramatiquement réduit dans les organes $fzd4^{-/-}$ comparé au réseau des organes de souris sauvages. Nous avons donc voulu étudier la capacité des CE $fzd4^{-/-}$ à générer ces branchements vasculaires dans un modèle en 3D d'angiogenèse *in vitro* sur Matrigel. Ce processus semble être perturbé par la délétion du gène $fzd4$ puisque le nombre de tubes formés dans le matrigel sous l'action du VEGF-A est réduit (**Figure 60**). Les cellules $fzd4^{-/-}$ restent plutôt en amas contrairement aux cellules $fzd4^{+/+}$ qui forment un réseau de tubes. Ce résultat suggère que Fzd4 régulerait aussi le mécanisme de différenciation des CE en tubes endothéliaux lors de l'angiogenèse.

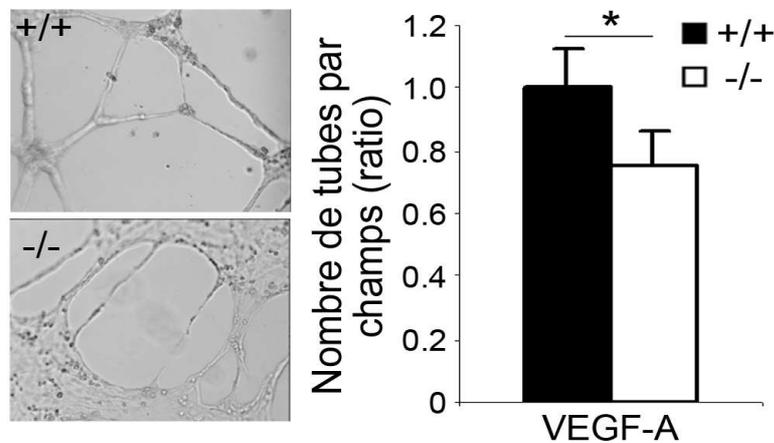


Figure 60: Effet de la délétion de $fzd4$ sur la différenciation des CE en tubes endothéliaux

Analyse par un test d'angiogenèse *in vitro* de la formation de tubes endothéliaux formés à partir des CE primaires après 6 h sur matrigel sous VEGF-A. L'histogramme représente le nombre de tubes formés par champs rapporté à celui des cellules $fzd4^{+/+}$ (n=3).

*, $p < 0.05$

3. Mécanismes moléculaires régulés par Fzd4

a) Analyse de la modulation des gènes induite par la délétion de *fzd4*

(1) Analyse génomique par MicroArray

Les travaux précédents démontrent que Fzd4 affecte la formation des vaisseaux en régulant différentes propriétés des cellules vasculaires nécessaires à l'angiogenèse. Pour étudier les mécanismes mis en jeu, une analyse par micro array a été réalisée sur des cœurs nouveaux-nés de souris *fzd4*^{-/-} versus *fzd4*^{+/+} afin de rechercher les gènes impliqués dans l'angiogenèse qui sont modulés par la délétion du gène *fzd4* (**Figure 61**). Une comparaison statistique des transcriptomes des cœurs sauvages et *fzd4*^{-/-} a été effectuée à l'aide de la méthode Gene Set Enrichment Analysis (GSEA). Dans cette analyse, 60 gènes présentent une expression différentielle, dont 43 sont régulés négativement et 17, positivement. Parmi ces gènes, deux grands groupes en ressortent qui sont modulés de manière très homogène :

(1) une diminution du facteur de transcription *E2F1* et de ses gènes cibles, impliqués dans la progression du cycle cellulaire (**Tableau 19**). Ce résultat suggère que la perte de *fzd4* conduirait à un arrêt du cycle cellulaire.

(2) une augmentation de l'expression des gènes à activité pro-angiogénique, traduisant une réponse pro-angiogénique compensatoire en réponse à la délétion du gène *fzd4* qui passerait essentiellement via la signalisation TGF- β (**Tableau 20**). En effet, plusieurs membres de la signalisation TGF- β tels que *TGF- β R2*, *BMP4* et *BMPER* se retrouvent augmentés dans les cœurs *fzd4*^{-/-}.

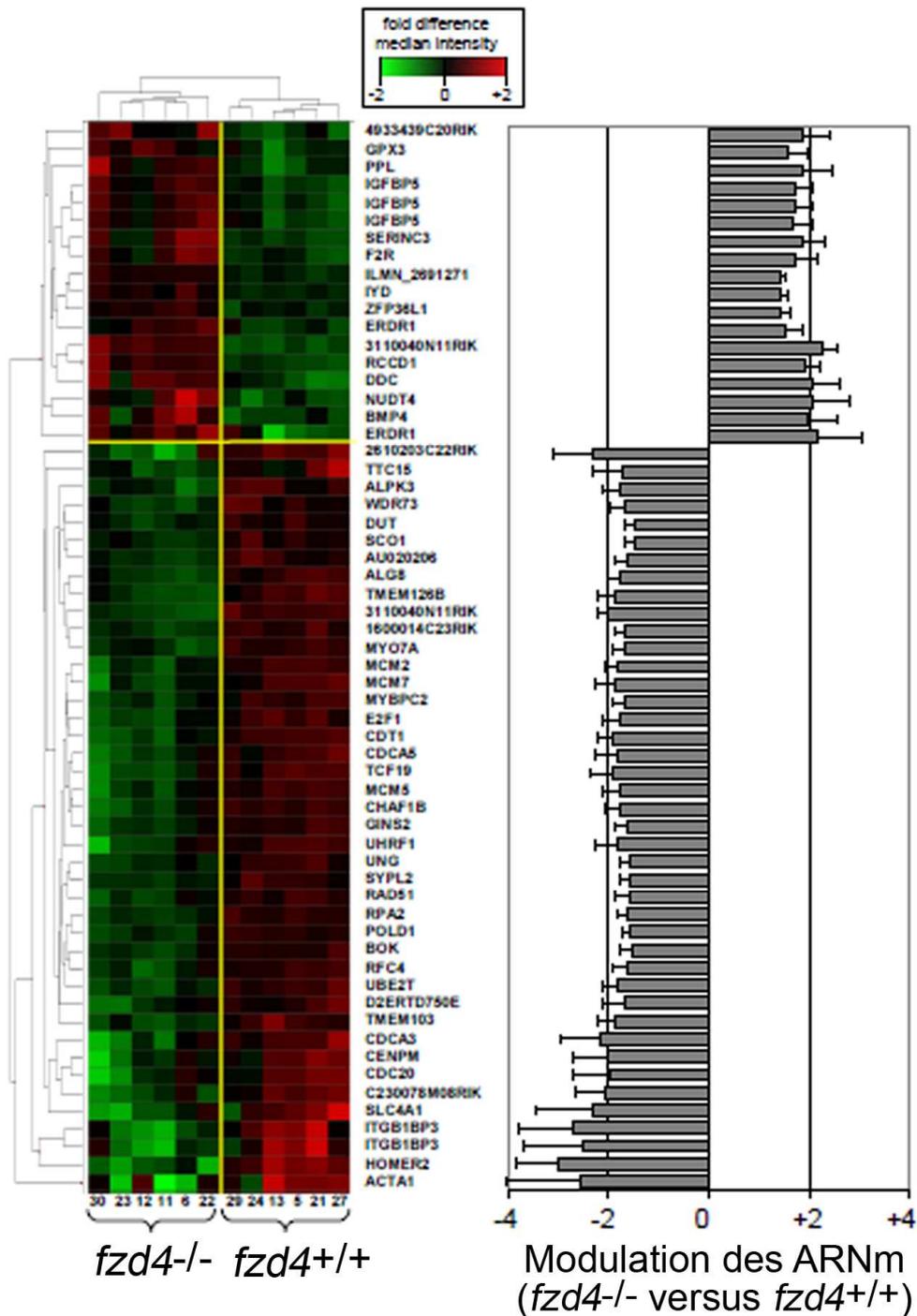


Figure 61: Effet de la délétion de *fzd4* sur l'expression transcriptionnelle des gènes de cœurs de souris *fzd4*^{-/-} versus *fzd4*^{+/+}

Analyse de la modulation des gènes de cœurs nouveaux-nés de souris *fzd4*^{-/-} comparée à celle de souris *fzd4*^{+/+} par microarray (*fzd4*^{+/+}, n=6 ; *fzd4*^{-/-}, n=6). Une comparaison statistique des transcriptomes des cœurs sauvages et *fzd4*^{-/-} a été effectuée à l'aide de la méthode Gene Set Enrichment Analysis (GSEA).

Symbole	Produit	Entrez ID	x-fold	p-value, FDR%
SUV39H1	Suppressor of variegation 3-9 homolog 1	6839	-1.39	0.011, 49%
CDT1	Chromatin licensing and DNA replication factor 1	81620	-1.92	0.00002, 3%
NUP62	Nucleoporin 62kDa	23636	-1.42	0.0009, 21%
POLD1	Polymerase, delta1	5424	-1.55	0.0006, 18%
MCM2	Minichromosome maintenance deficient 2, mitotin	4171	-1.79	0.00003, 4%
E2F1	E2F transcription factor 1	1869	-1.79	0.00007, 6%
CDC45L	Cell division cycle 45-like	8318	-1.60	0.0008, 20%
UNG	Uracil-DNA glycosylase	7374	-1.55	0.0007, 18%
RAD51	RAD51 homolog	5888	-1.59	0.0007, 20%
RFC5	Replication factor C 5, 36.5 kDa	5985	-1.41	0.01, 48%
DNMT1	DNA-methyltransferase 1	1786	-1.39	0.009, 48%
RPA2	Replication protein A2, 32 kDa	6118	-1.64	0.0003, 14%
MCM7	Minichromosome maintenance deficient 7	4176	-1.84	0.0001, 8%
XPO5	Exportin 5	57510	-1.20	0.13, 85%
RQCD1	RCD1 required for cell differentiation1	9125	-1.21	0.11, 83%
AP4M1	Adaptor-related protein complex 4, mu 1 subunit	9179	-1.25	0.088, 81%
CDC6	Cell division cycle 6 homolog	990	-1.60	0.038, 35%
PRPS1	Phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 1	5631	-1.22	0.051, 73%
LIG1	Ligase I, DNA, ATP-dependent	3978	-1.45	0.0069, 43%
HIST1H3A	Histone cluster 1, H3	8350	-1.65	0.0014, 25%
MAPT	Microtubule-associated protein Tau	4137	-1.30	0.013, 51%
USP52	Ubiquitin specific peptidase 52	9924	-1.19	0.17, 87%
MCM6	Minichromosome maintenance deficient 6	4175	-1.51	0.0048, 39%
PPP1CC	Protein phosphatase 1, catalytic subunit, gamma	5501	-1.19	0.15, 86%
NDUFA11	NADH dehydrogenase 1 alpha subcomplex 11	126328	-1.15	0.021, 60%
RRM2	Ribonucleotide reductase M2 polypeptide	6241	-1.79	0.0014, 25%

Tableau 19: Gènes impliqués dans le cycle cellulaire régulés négativement suite à la délétion de *fzd4* dans les cœurs nouveaux-nés

Symbole	Produit	Entrez ID	x-fold	p-value, FDR%
BMP4	Bone morphogenetic protein 4	12159	+1.94	0.0006, 18%
F2R	Coagulation factor II (thrombin) receptor	14062	+1.72	0.0001, 3%
DPP4	di-peptidyl peptidase 4	13482	+1.64	0.003, 31%
sFRP1	Secreted frizzled-related protein 1	20377	+1.64	0.004, 35%
EDNRB	Endothelin receptor type B	13618	+1.61	0.0008, 20%
VEGFC	Vascular endothelial growth factor C	22341	+1.41	0.10, 82%
ADM	Adrenomedullin	11535	+1.38	0.008, 46%
ENPP2	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2	18606	+1.35	0.021, 60%
FGF12	Fibroblast growth factor 12	14167	+1.35	0.033, 67%
BMPER	BMP-binding endothelial factor	73230	+1.32	0.032, 66%
Flt1	FMS-like tyrosine kinase 1	14254	+1.26	0.008, 47%
TGF- β R2	Transforming growth factor, beta receptor II	21813	+1.12	0.19, 89%
TK1	Thymidine kinase 1	21877	-1.64	0.004, 38%
CSDA (Ybx3)	Cold shock domain protein A	56449	+2.33	0.001, 24%
IGFBP5	Insulin-like growth factor binding protein 5	16011	+1.70	0.0001, 7%
PDGFB	Platelet derived growth factor, B polypeptide	18591	-1.26	0.045, 72%

Tableau 20: Gènes impliqués dans la réponse angiogénique régulés positivement suite à la délétion de *fzd4* dans les cœurs nouveaux-nés

La modulation de ces deux groupes de gènes est donc une piste dans la compréhension des mécanismes moléculaires générés par Fzd4 dans les cellules vasculaires. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés au facteur de transcription E2F1, et au récepteur TGF- β R2 ainsi qu'à un de ses ligands, le TGF- β 1, dans la continuité de cette étude.

(2) Analyse transcriptionnelle par PCR quantitative

Une analyse par qPCR de ces gènes cibles a confirmé la modulation de ces gènes dans les reins et cœurs des souris *fzd4*^{-/-} nouveaux-nés. En effet, on retrouve la diminution du gène codant pour le facteur de transcription E2F1 dans ces deux organes *fzd4*^{-/-} (**Figure 62**). Ceci suggère que la prolifération des cellules est réduite dans le cœur et les reins sous la délétion de *fzd4*, et concorde avec la diminution de la prolifération retrouvée dans les CE et les MEF *fzd4*^{-/-} et *fzd4*KD.

La signalisation TGFβ semble également être modulée par la délétion de *fzd4* d'après les résultats du microarray. Cette augmentation du taux d'ARNm *TGF-βR2* est confirmée par PCR quantitative dans les cœurs et les reins de souris nouveaux-nés *fzd4*^{-/-} comparées aux souris sauvages (**Figure 62**). Le taux de transcripts *TGF-β1*, un ligand du TGF-βR2, a aussi été analysé en PCR quantitative afin de voir si Fzd4 régule l'expression de ce ligand. Le micro array n'a pas montré de variation de ce facteur dans les cœurs *fzd4*^{-/-}, et au niveau transcriptionnel, on ne retrouve pas non plus de variation de *TGF-β1* dans les reins et cœurs de souris *fzd4*^{-/-}.

La formation des vaisseaux étant un processus cellulaire principal dans la rétine, et comme la délétion de *fzd4* altère la formation du réseau vasculaire rétinien secondaire et tertiaire (Xu et al. 2004), nous avons analysé par qPCR la modulation de ces gènes dans la rétine collectée 5 jours après la naissance. De façon attendue, le taux de transcripts *E2F1* est diminué dans les rétines *fzd4*^{-/-}. En revanche, le taux d'ARNm *TGF-βR2* se retrouve également diminué, contrairement aux cœurs et aux reins *fzd4*^{-/-} (**Figure 62**). Ceci suggère que la signalisation TGF-β est plus affectée par la délétion de *fzd4* dans ce tissu où le réseau de cellules vasculaires y est très développé, alors que l'augmentation du *TGF-βR2* observée dans des organes en développement reflète un effet compensatoire à la perte de *fzd4*.

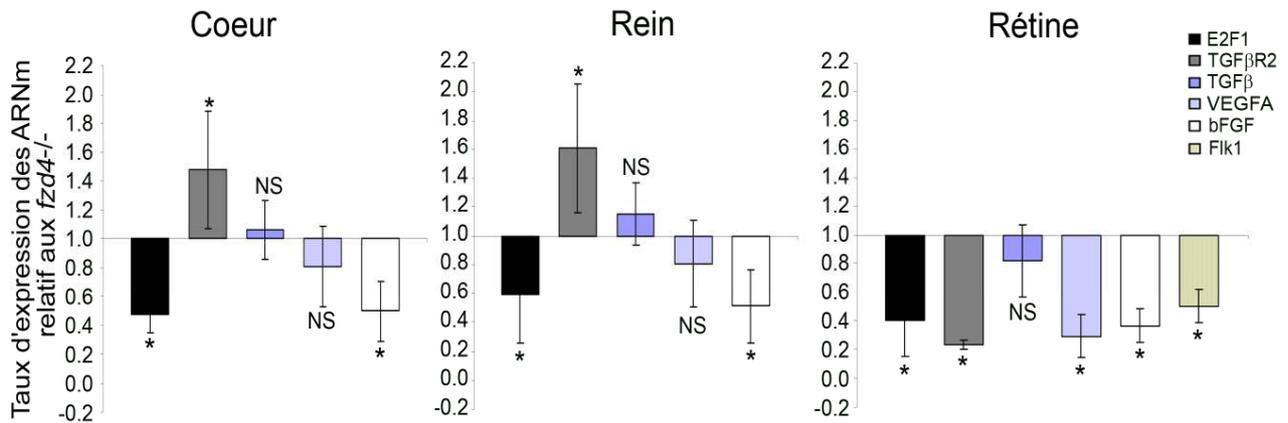


Figure 62: Effet de la délétion de *fzd4* sur l'expression transcriptionnelle des gènes du cœur, du rein et de la rétine de souris *fzd4*^{-/-} versus *fzd4*^{+/+}

Analyse par qPCR de la modulation des gènes *E2F1*, *TGF-βR2*, *TGF-β1*, *VEGF-A*, *bFGF* et *Flk1* dans le cœur (n=4), les reins (n=4) et la rétine (n=5) de souris nouveaux-nés *fzd4*^{-/-} comparée à celle des souris *fzd4*^{+/+}.

NS, non significatif ; *, p<0.05

Enfin, d'autres facteurs de croissance tels que le VEGF-A et le bFGF, qui sont impliqués dans le branching artériel, ont aussi été analysés par PCR quantitative. L'expression du VEGF-A n'est pas modifiée dans le cœur et les reins *fzd4*^{-/-} comparés aux organes de souris sauvages. En revanche, la rétine présente un taux d'ARNm *VEGF-A* diminué de 0.71±0.15 fois (**Figure 62**). Il se pourrait que cette diminution soit la conséquence du manque de capillaires dû à la perte de *fzd4* dans les organes, et non à un effet direct de *fzd4*. Le rôle de Fzd4 sur la voie du VEGF-A dans les cellules vasculaires ne sera donc pas étudié par la suite.

En ce qui concerne le bFGF, la délétion du gène *fzd4* semble diminuer significativement le taux d'ARNm *bFGF* dans le cœur, les reins et la rétine de souris *fzd4*^{-/-} (**Figure 62**). Ce résultat suggère une autre cible potentielle de Fzd4, le bFGF, qui pourrait expliquer le défaut de branching artériel et de maturation des vaisseaux induit par la perte de *fzd4*.

b) Implication de Fzd4 dans la régulation d'autres voies de signalisation

La modulation de ces gènes cibles a été analysée dans chacune des cellules primaires isolées, dans le but de comprendre les mécanismes moléculaires mis en jeu par Fzd4 dans les cellules vasculaires lors de l'angiogenèse.

(1) Implication de Fzd4 dans la régulation du cycle cellulaire via le facteur de transcription E2F1

In vitro, spécifiquement dans les CE et les MEF, nous retrouvons une diminution du taux d'ARNm *E2F1*. Ce résultat traduit une diminution du cycle cellulaire suite à la perte de *fzd4*, et serait associé à l'inhibition de la prolifération des CE et des MEF (**Figure 63**).

Cette diminution du taux d'*E2F1* n'est pas retrouvée dans les CML, où l'on n'observait pas d'effet de Fzd4 sur la prolifération de ces cellules. Fzd4 ne semble donc pas réguler la prolifération des CML.

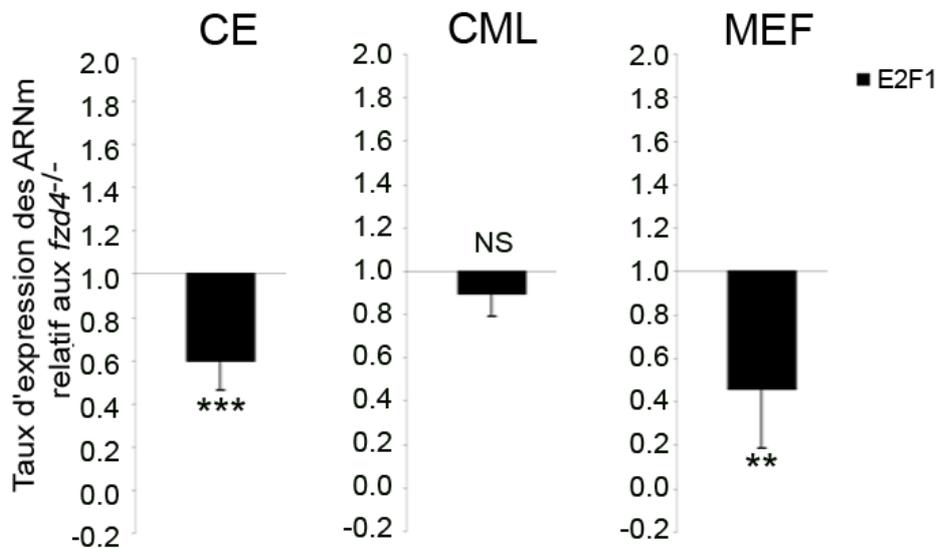


Figure 63: Effet de la délétion de *fzd4* sur l'expression transcriptionnelle du gène *E2F1* dans les cellules vasculaires de souris *fzd4*^{-/-} versus *fzd4*^{+/+}

Analyse par qPCR de la modulation du gène *E2F1* dans les CE, CML et MEF primaires de souris *fzd4*^{-/-} comparée à celle des souris *fzd4*^{+/+} (n=6).

NS, non significatif ; **, p<0.005 ; ***, p<0.001

(2) Implication de *Fzd4* dans la régulation de la signalisation TGF- β

Nous observons également la modulation des gènes de la signalisation du TGF- β , mais avec une diminution du taux d'ARNm *TGF- β R2*, et ce, spécifiquement dans les CE et les MEF (**Figure 64**). Le taux de *TGF- β R2* ne semble pas être touché dans les CML. Cette modulation rappelle celle retrouvée dans la rétine, montrant que la signalisation TGF- β est plutôt affectée directement dans les cellules vasculaires, et plus particulièrement dans les CE. D'ailleurs, celles-ci présentent également une augmentation du nombre d'ARNm *TGF- β* , suggérant un effet compensatoire à la diminution de son récepteur.

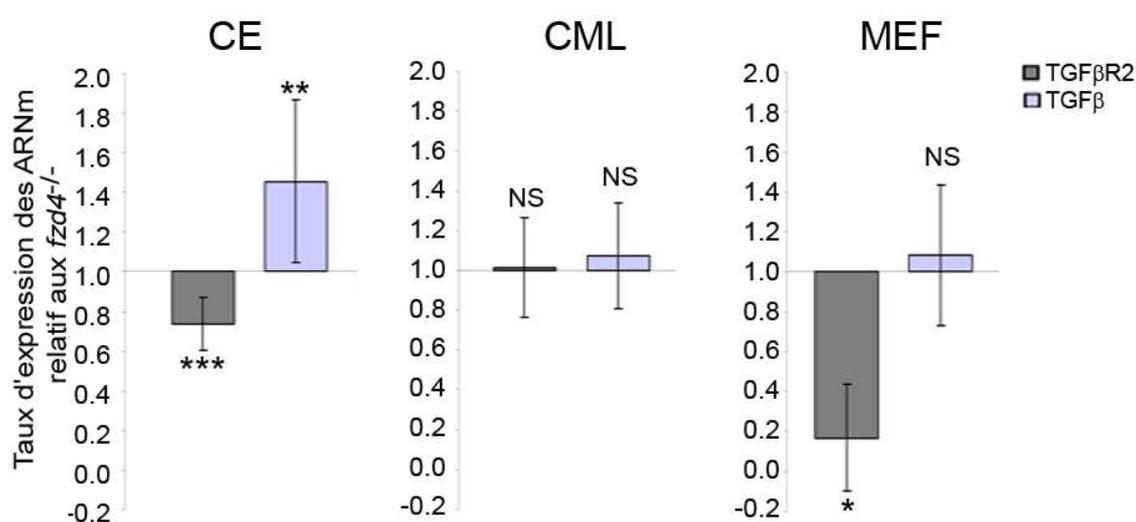


Figure 64: Effet de la délétion de *fzd4* sur l'expression transcriptionnelle des gènes *TGF- β R2* et *TGF- β 1* dans les cellules vasculaires de souris *fzd4*^{-/-} versus *fzd4*^{+/+}
 Analyse par qPCR de la modulation des gènes *TGF- β R2* et *TGF- β 1* dans les CE, CML et MEF primaires de souris *fzd4*^{-/-} comparée à celle des souris *fzd4*^{+/+} (n=6).
 NS, non significatif ; *, p<0.05 ; **, p<0.005 ; ***, p<0.001

Nous avons ensuite recherché si la perte de *fzd4* modulait aussi la voie de signalisation engendrée par le TGF- β 1. Cette signalisation met en jeu plusieurs partenaires intracellulaires, smad2/3 et smad1/5/8, impliqués dans différentes fonctions. On observe que la délétion de *fzd4* altère la signalisation TGF- β 1/smad2 spécifiquement dans les CE et MEF (**Figure 65A et 65B**). En effet, la phosphorylation de la protéine cytoplasmique Smad2 est diminuée sous activation par le TGF- β 1 dans les cellules délétées pour *fzd4* comparées aux cellules contrôles. La réponse TGF- β 1/smad2 est également altérée dans la lignée endothéliale HMEC-1 dans lesquelles le gène *fzd4* a été éteint par ARN interférence, confirmant l'effet de la délétion de *fzd4* sur la signalisation TGF- β 1/smad2 dans les CE (**Figure 65A**). On ne

retrouve pas d'altération de cette signalisation dans les CML. De plus, pour les 3 types de cellules, la signalisation TGF- β /smad1/5/8 ne semble pas être touchée par la perte de *fzd4* puisque le taux de phosphorylation de Smad1/5/8 est le même dans les cellules *fzd4*^{+/+} et *fzd4*^{-/-} ou *fzd4*KD.

Fzd4 aurait donc un rôle régulateur spécifiquement sur la signalisation Smad2 engendrée par le TGF- β 1 dans les CE et les MEF. Comme la formation des vaisseaux dépend notamment de cette signalisation TGF- β (Gaengel et al. 2009), la délétion de *fzd4* contribuerait à un développement anormal des vaisseaux à travers une altération de la signalisation TGF- β spécifiquement dans les CE.

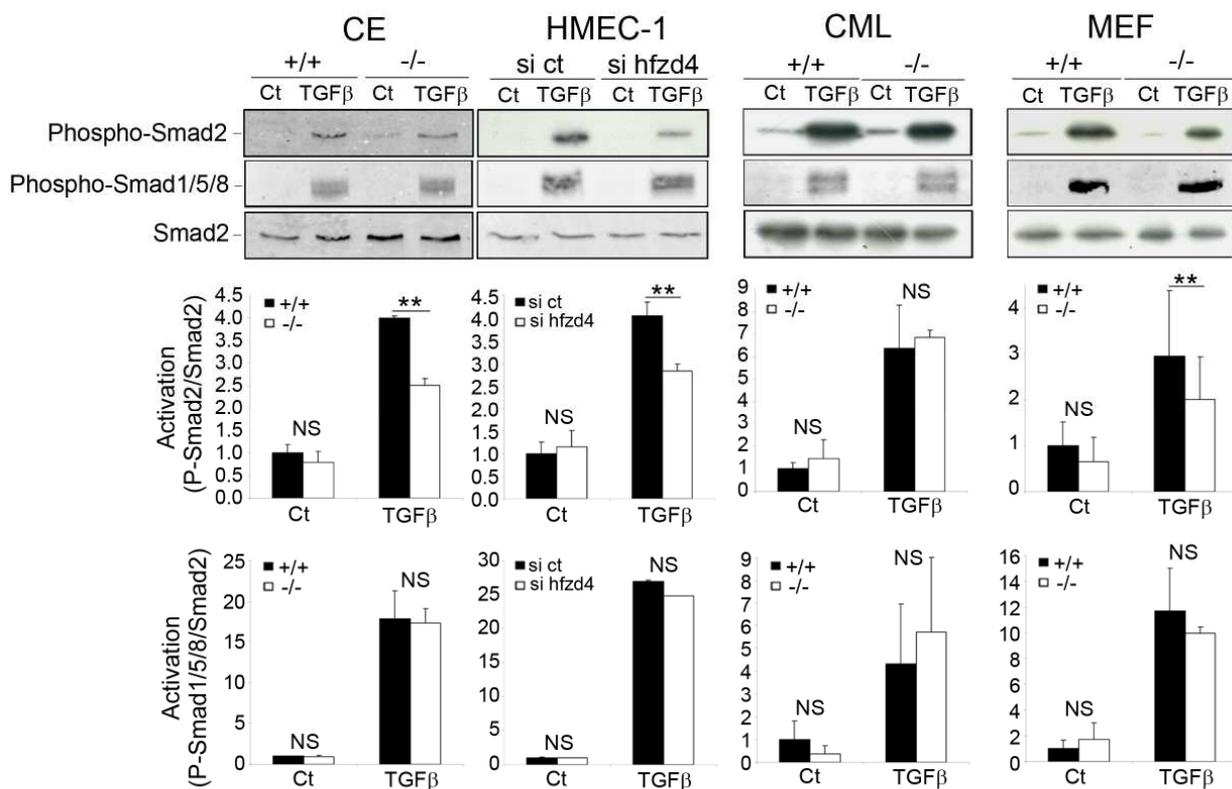


Figure 65: Effet de la délétion de *fzd4* sur la signalisation du TGF- β 1 dans les cellules vasculaires

Analyse par Western Blot de la phosphorylation de Smad2 et Smad1/5/8 en réponse au TGF- β 1 dans les CE, CML et MEF primaires de souris *fzd4*^{+/+} et *fzd4*^{-/-}, et dans les HMEC-1 après extinction du gène *hfzd4* par ARN interférence. Les histogrammes représentent l'activation du taux de Smad2 ou Smad1/5/8 phosphorylé rapporté à celui de Smad2 total en fonction de l'activation des cellules contrôles (CE, n=2; HMEC-1, n=3; CML, n=3; MEF, n=5).

NS, non significatif ; **, p<0.005

(3) Implication de *Fzd4* dans la régulation de la signalisation *bFGF*

Enfin, l'analyse par qPCR des gènes dans les cœurs, les reins et la rétine de souris *fzd4*^{-/-} comparé à celle des organes des souris *fzd4*^{+/+} a également révélé une importante diminution du taux d'ARNm *bFGF*, et donc une autre cible potentielle de *Fzd4* (**Figure 62**). On retrouve cette diminution du taux d'ARNm dans les MEF et les CML, mais pas dans les CE (**Figure 66**).

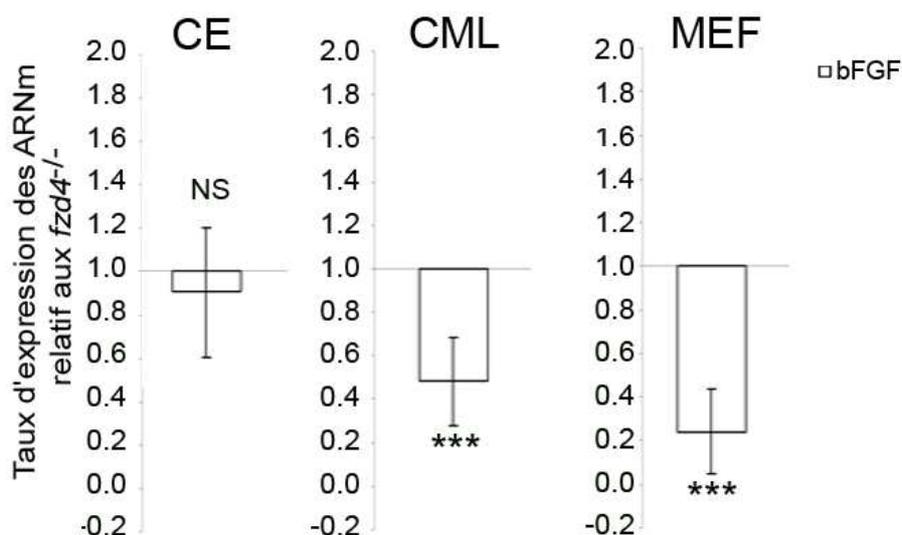


Figure 66: Effet de la délétion de *fzd4* sur l'expression transcriptionnelle du gène *bFGF* dans les cellules vasculaires de souris *fzd4*^{-/-} versus *fzd4*^{+/+}

Analyse par qPCR de la modulation du gène *bFGF* dans les CE, CML et MEF primaires de souris *fzd4*^{-/-} comparée à celle des souris *fzd4*^{+/+} (n=6).

NS, non significatif ; *** , p<0.001

A partir de ces résultats, nous avons investigué l'étude de la signalisation du *bFGF* dans les CML et les MEF. La modulation du *bFGF* dans ces cellules s'accompagne d'une perte de la signalisation *bFGF*/Akt/p42/p44MAPK. En effet, la phosphorylation des kinases Akt et p42/p44MAPK est réduite dans les CML et les MEF (**Figure 67**). Comme contrôle, nous avons vérifié que les cellules *fzd4*^{-/-} pouvaient répondre à d'autres facteurs de croissance et que la perte de la signalisation des cellules *fzd4*^{-/-} est spécifique de l'activation du *bFGF*. Pour cela, nous avons activé les cellules avec un autre facteur de croissance angiogénique, le PDGF-BB. Celui-ci induit la phosphorylation d'Akt et de p42/p44MAPK que ce soit dans les cellules *fzd4*^{+/+} ou *fzd4*^{-/-}. La délétion de *fzd4* altère donc spécifiquement la réponse au *bFGF*. Ces résultats mettent en évidence un contrôle de *Fzd4* sur la voie du *bFGF*, où la délétion de *fzd4* diminue le taux de *bFGF* et altère la voie *bFGF*/Akt/p42/p44MAPK, deux effets associés à l'inhibition de la migration des cellules vasculaires *fzd4*^{-/-} observée sous *bFGF*.

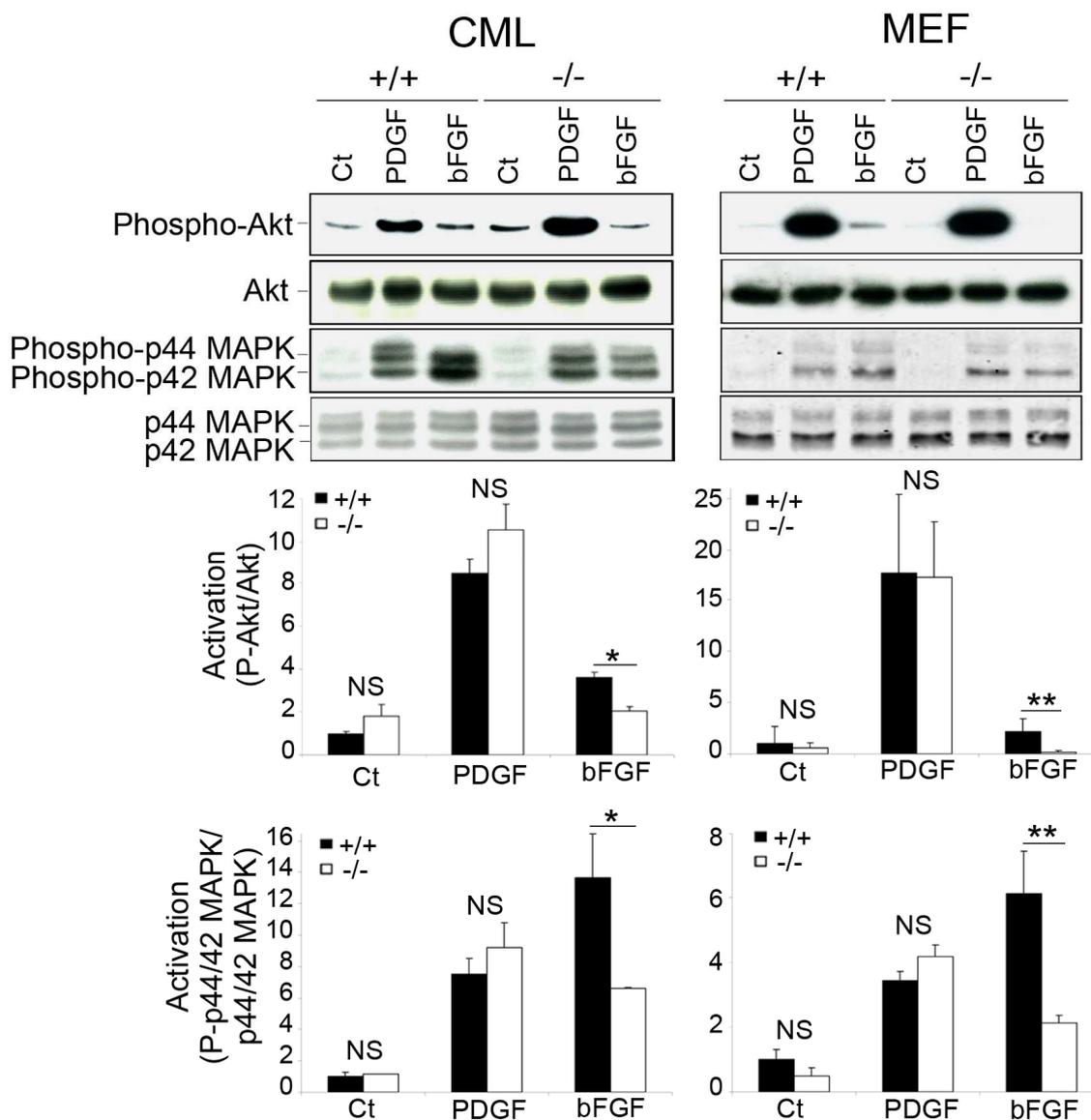


Figure 67: Effet de la délétion de *fzd4* sur la signalisation du bFGF dans les CML et les MEF

Analyse par Western Blot de la phosphorylation des kinases Akt et p42/p44MAPK en réponse au PDGF-BB et au bFGF dans les CML et les MEF primaires de souris *fzd4*^{+/+} et *fzd4*^{-/-}. Les histogrammes représentent l'activation du taux de Akt et de p42/p44MAPK phosphorylé rapporté respectivement à celui de Akt et p42/p44MAPK total en fonction de l'activation des cellules contrôles (CML, n=3; MEF, n=5).

NS, non significatif ; *, p<0.05 ; **, p<0.005

C. Conclusion, discussion et perspectives

Les résultats de cette étude ont mis en évidence un phénotype artériel induit par la délétion du gène *fzd4*, montrant que la protéine Fzd4 joue un rôle central dans la formation des petites artères d'importants organes périphériques. Fzd4 semble réguler certaines propriétés des cellules vasculaires mises en jeu dans l'angiogenèse en contrôlant différentes voies de signalisation, et régule ainsi la morphogenèse des ramifications vasculaires *in vivo*.

L'implication du système Wnt, et plus particulièrement de Fzd4, dans la vascularisation n'est connue que depuis quelques années. En plus de son rôle central dans la formation du réseau vasculaire rétinien (Xu et al. 2004), les études précédentes ont détecté *fzd4* dans différents lits vasculaires, notamment dans la vasculature entourant l'embryon, celle de l'utérus, celle des ovaires et celle du cervelet (Hayashi et al. 2009; Masckauchan et al. 2006; Masckauchan et al. 2006). Dans cette étude, nous avons montré l'expression de *fzd4* dans d'autres lits vasculaires tels que la vasculature des reins, du cœur et du muscle de la patte de souris, ainsi que dans les gros vaisseaux tels que l'aorte et la carotide. L'expression de *fzd4* s'étend donc sur la vasculature de plusieurs territoires chez l'adulte, allant du système nerveux à différents tissus périphériques, démontrant l'implication de ce récepteur et la fonctionnalité de sa signalisation dans l'angiogenèse de ces différents territoires.

Les autres récepteurs Fzd sont également exprimés dans les cellules vasculaires (Cheng et al. 2003; Masckauchan et al. 2005; Wright et al. 1999), et *in vivo*, dans une variété de tissus vasculaires comme dans l'aorte et le tronc pulmonaire pour Fzd2 (Castoldi et al. 2005; van Gijn et al. 2001), les vaisseaux du placenta et du sac vitellin pour Fzd5 (Ishikawa et al. 2001) et dans certains vaisseaux sanguins et dans l'utérus durant l'implantation pour Fzd6 (Hayashi et al. 2009). Au laboratoire, nous avons d'ailleurs détecté une expression très importante de *fzd6* sur l'endothélium des artères et des veines (R. Chauvel, résultats non publiés). Certains récepteurs Fzd sont donc coexprimés à différents endroits de l'arbre vasculaire, suggérant une redondance dans l'activité angiogénique de ces Fzd. En effet, une étude des souris délétées du gène *fzd6* a débuté au laboratoire et montre un phénotype artériel également altéré dans les reins de ces souris transgéniques (R. Chauvel et B. Seguy, résultats non publiés). Ce résultat démontre qu'il existe une certaine redondance dans l'activité de certains Fzd à réguler la morphogenèse vasculaire. Cependant, cette redondance est spécifique de certains tissus puisque par exemple, les défauts vasculaires observés dans la rétine des souris *fzd4*^{-/-} ne sont pas retrouvés dans les souris transgéniques délétées pour un autre gène *fzd*. Ceci est un

exemple parmi les différents KO des gènes *fzd* générés (van Amerongen et al. 2006) et démontre ainsi une certaine spécificité du rôle des récepteurs Fzd dans la formation des vaisseaux.

Nous montrons également que *fzd4* est exprimé dans les CE et les CML des artères, des petites artérioles et des capillaires, mais pas dans les veines. Son profil d'expression artériel et non veineux suggère un rôle spécifique de Fzd4 dans la morphogenèse artérielle, où il contrôle l'induction et le « branching » des petites artères dans les parties distales des tissus. Le réseau artériel incomplet observé dans le cœur, les reins et les pattes des souris *fzd4^{-/-}* confirme cette hypothèse, d'autant plus que le marqueur artériel EphrinB2 se retrouve fortement diminué dans le cœur et les reins des souris *fzd4^{-/-}*. Fzd4 pourrait donc être impliqué dans la différenciation artério-veineuse parmi les autres facteurs connus comme le système Eph/Ephrine, suggérant un nouveau rôle de la signalisation Wnt dans ce processus.

Le phénotype artériel des reins de ces souris rappelle celui observé chez les souris déficientes en *synectine* (Chittenden et al. 2006). Ces souris présentent un nombre d'artères réduit et un « branching » artériel incomplet, sans défaut au niveau du système veineux. Les auteurs l'expliquent par une diminution de la formation des tubes endothéliaux, de la migration, de la prolifération et de la polarisation spécifiquement des cellules endothéliales artérielles et non veineuses. La synectine est donc impliquée dans la régulation de la formation des artères, et Fzd4 semble l'être aussi. Ces phénotypes communs sont à prendre en considération, et pourraient mettre en évidence un partenariat entre ces 2 protéines. En effet, la synectine est une protéine d'échafaudage impliquée dans le trafic vésiculaire, qui peut notamment lier le domaine cytoplasmique du syndecan-4 du récepteur FGF et est donc impliquée dans divers processus cellulaires angiogéniques (Gao et al. 2000). La synectine contient un domaine PDZ, et peut ainsi interagir avec divers partenaires à domaine de liaison au domaine PDZ. Une interaction entre Fzd3 et l'orthologue de la synectine chez le xénope, *kermit*, a été démontrée il y a plusieurs années (Dann et al. 2001; Tan et al. 2001). Cette interaction permet la modulation de la voie Wnt dans le développement des crêtes neurales. C'est pourquoi il n'est pas à exclure un partenariat entre ces 2 acteurs dans la régulation de la morphogenèse artérielle. Cette étude fait l'objet d'un futur projet pour lequel nous avons obtenu certaines constructions synectine de l'équipe de Simons (Naccache et al. 2006).

Malgré ces défauts artériels et la réduction de la taille du corps des souris *fzd4^{-/-}*, aucune altération structurale et aucun défaut dans les fonctions cardiaques et rénales, ni dans la pression sanguine systémique, n'ont été détectés, suggérant le rôle spécifique de Fzd4 dans le

lit vasculaire. De plus, la délétion de *fzd4* ne toucherait que la formation des petites artères du cœur, des reins et des pattes comme on a pu le voir par analyse au microCT, les artères principales restant normales. De même, la réactivité artérielle en réponse au flux est fortement inhibée dans les artères mésentériques et cérébrales de faible diamètre. Lorsque l'on analyse les propriétés hémodynamiques en réponse à des stimuli mécaniques d'une grosse artère qu'est la carotide, on n'observe aucune altération suite à la perte de *fzd4*. Il est donc clair que Fzd4 régule la formation et les propriétés des petits vaisseaux.

Parmi les paramètres vasculaires mesurés dans les petites artères de souris *fzd4*^{-/-}, seule la réponse au flux est fortement inhibée. La dilatation au flux met en jeu les CE et les CML, qui perçoivent diverses forces (pression et cisaillement) suite à l'écoulement du sang le long de la paroi endothéliale, et qui communiquent entre elles via différents mécanismes et voies de signalisations pour s'adapter à leur nouvel environnement hémodynamique. La mécanotransduction, c'est-à-dire la transmission du signal mécanique en signal chimique, est réalisée par l'intermédiaire de nombreux senseurs présents à la membrane plasmique des cellules (intégrines, canaux ioniques, caveolae,..), puis grâce à des composants structuraux cellulaires (cytosquelette, jonctions intercellulaires, contacts focaux, ...) (Lehoux et al. 2006; Loufrani et al. 2008). Cette signalisation aboutit à la relaxation des CML qui induit une dilatation des vaisseaux sanguins. Cependant, les mécanismes par lesquels les forces mécaniques dans les artères sont ressentis et convertis en signaux biochimiques dans les cellules vasculaires restent encore peu connus. La perte de la dilatation au flux des petites artères *fzd4*^{-/-} montrent que Fzd4 joue un rôle fonctionnel dans la mécanotransduction des petites artères de résistance. Ce rôle spécifique est très important, et n'a encore jamais été investigué pour les récepteurs Fzd. Ces défauts de dilatation pourrait réduire la perfusion sanguine des tissus dans les souris *fzd4*^{-/-}, et donc empêcher la formation des petits vaisseaux dans les parties distales des organes puisqu'il a été montré que la morphogenèse des ramifications vasculaires serait sous le contrôle du flux sanguin (le Noble et al. 2004).

Nos résultats reflètent un défaut dans la mécanotransduction plutôt que dans la fonction endothéliale. En effet, la délétion de *fzd4* n'affecte pas la dilatation dépendante du NO des petites artères induite par l'acétylcholine, et les réponses contractiles aux différents agents pharmacologiques ainsi que le tonus myogénique ne sont pas altérés non plus. Le rôle de Fzd4 dans la mécanotransduction étant nouveau, sa cible ou ses cibles ne sont pas connus. Fzd4 pourrait contrôler plusieurs des composants impliqués dans ce processus, et empêcher la communication entre les cellules vasculaires nécessaire à la relaxation du muscle lisse. Nous

avons montré que sFRP1 induisait l'étalement des CE via l'activation des intégrines $\alpha_2\beta_1$, mettant en jeu une régulation négative de Fzd4 par sFRP1 (Dufourcq et al. 2008). Cette étude est un exemple démontrant que le récepteur Fzd4 a un impact sur certains des composants impliqués dans la réponse au flux, comme les intégrines; cependant, un lien direct entre les éléments impliqués dans la mécanotransduction et les récepteurs Fzd au cours de la réponse aux forces de cisaillement n'a pas été montré. C'est pourquoi il sera intéressant d'étudier l'implication de Fzd4 dans ce processus, et nous nous intéresserons plus particulièrement à l'effet de Fzd4 sur la régulation des composants structuraux tels que le cytosquelette. En effet, les récepteurs Fzd transduisent notamment la signalisation Wnt non canonique en affectant l'organisation du cytosquelette des cellules. Dans l'article III présenté, nous avons d'ailleurs montré que Fzd4 a un rôle sur l'étalement des CE en modulant l'organisation des CE par la régulation de la dynamique de leur cytosquelette d'actine. (Dufourcq et al. 2008). Le cytosquelette est donc une cible potentielle dans la régulation de la réponse aux forces de cisaillement par Fzd4.

Les résultats observés dans cette étude amènent à se demander quelle signalisation Wnt/Fzd est impliquée dans le système vasculaire. Des études précédentes ont montré un rôle fonctionnel de la signalisation canonique dépendante de la β -caténine dans les CE (Goodwin et al. 2002). Cependant, il a été proposé que la voie Wnt/ β -caténine soit fonctionnelle seulement lors de l'angiogenèse du système nerveux central durant le développement, et pas dans les tissus périphériques tels que le cœur et le rein. Chez l'adulte, l'activation du système Lef/TCF, rapporteur de la voie canonique, est diminuée dans les lits vasculaires du système nerveux central (Daneman et al. 2009; Stenman et al. 2008). L'inactivation conditionnelle de la β -caténine dans les CE démontre un rôle majeur de la β -caténine dans la maturation de la barrière hématoencéphalique (Cattellino et al. 2003). Dans l'article III présenté, nous avons montré que sFRP1, le modulateur de la signalisation Wnt, est capable d'activer la signalisation non canonique d'une manière dépendante de Rac1 dans les CE (Dufourcq et al. 2008). Ces données nous conduisent à émettre l'hypothèse que Fzd4 activerait une signalisation indépendante de la voie canonique dans les CE des organes périphériques.

En résumé, nous avons montré *in vivo* que Fzd4 est un récepteur nécessaire à la croissance et au branchement du réseau artériel durant le développement chez l'adulte. La formation des néo-vaisseaux requiert la prolifération et la migration des cellules vasculaires afin que des bourgeons angiogéniques se forment et poussent pour créer un réseau vasculaire. Comprendre

comment Fzd4 régule la formation vasculaire nous a ainsi amené à analyser les propriétés de cellules vasculaires primaires isolées à partir de ces souris *fzd4^{-/-}* et *fzd4^{+/+}*. En plus du rôle de Fzd4 sur l'étalement des CE (Dufourcq et al. 2008), nous avons montré que Fzd4 est aussi impliqué dans d'autres fonctions cellulaires. Les différents effets générés par la délétion du gène *fzd4*, qui participent à ce phénotype artériel, sont schématisés dans la **figure 68**.

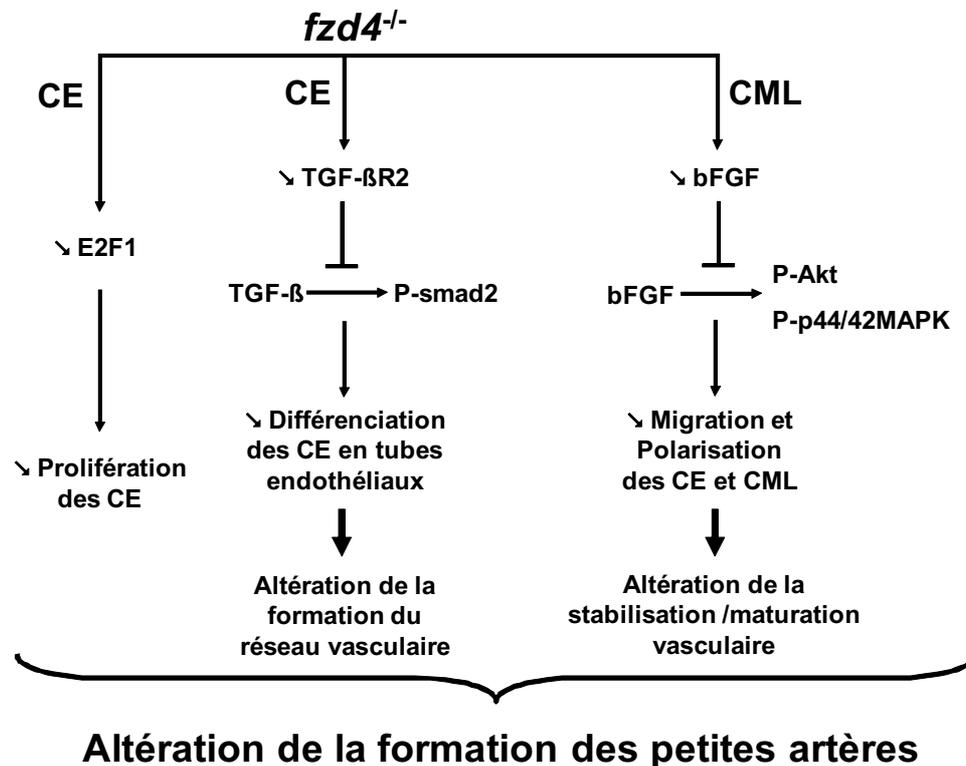


Figure 68: Schématisation des effets retrouvés suite à la délétion du gène *fzd4* sur les propriétés des cellules vasculaires

En premier lieu, nous avons constaté que Fzd4 ne régule pas les mêmes fonctions dans les CE et les CML, et que son rôle régulateur est spécifique du type cellulaire. L'utilisation des MEF comme contrôle a confirmé les résultats obtenus sur les cellules vasculaires. Ces cellules se comportent à la fois comme des CE et des CML, puisque la délétion de *fzd4* dans les MEF induit les mêmes altérations fonctionnelles. Ceci démontre que les MEF, d'origine embryonnaire, possèdent un phénotype intermédiaire aux cellules vasculaires.

Parmi les différentes propriétés des cellules vasculaires, Fzd4 semble être tout d'abord impliqué dans la prolifération des CE. Sa délétion bloque leur croissance, sans modifier celle des CML. Le rôle de Fzd4 dans la prolifération des CE semble impliquer le facteur de transcription E2F1, régulateur du cycle cellulaire. En effet, le taux d'ARNm d'*E2F1* est diminué de manière homogène dans les organes et dans les CE primaires isolées de souris

fzd4^{-/-}, et pas dans les CML. Nous ne savons pas encore si l'activation d'E2F1 via Fzd4 est directe ou indirecte. Quelques études ont lié ces 2 voies de signalisation, notamment celle de Zhou et al. qui ont montré que le facteur de transcription LEF1 de la voie canonique pouvait s'associer avec E2F1 et activer sa transcription et ses gènes cibles, indépendamment de la β -caténine (Zhou et al. 2008). Les résultats de cette étude nous permettent d'émettre l'hypothèse que Fzd4 réduirait la prolifération des CE via un mécanisme non canonique dépendant d'E2F1 dans les organes périphériques.

La signalisation TGF- β semble aussi être régulée par Fzd4. Non seulement la perte de *fzd4* induit une diminution du nombre d'ARNm *TGF- β R2* spécifiquement dans les CE et pas dans les CML, mais elle altère aussi la réponse TGF- β 1/Smad2 dans ces cellules. Comme nous l'avons décrit précédemment, le TGF- β induit des signalisations opposées sur la prolifération, la migration et la formation des tubes endothéliaux via 2 voies distinctes dans les cellules vasculaires (Goumans et al. 2002). La signalisation Alk5/Smad2/3 promouvrait plutôt la différenciation des CE, alors que Alk1/endoglin/Smad1/5 promouvrait plutôt la prolifération et la migration des CE (Gaengel et al. 2009). La délétion du *TGF- β 1* chez la souris ou celle de son récepteur *TGF- β R2* conduisent à un défaut de différenciation endothéliale et à une augmentation de la fragilité vasculaire dans le sac vitellin (Dickson et al. 1995; Oshima et al. 1996). Dans cette étude, nous avons décrit une altération de la formation des tubes endothéliaux des CE délétées du gène *fzd4*. Sur matrigel et en réponse au VEGF-A, ces cellules *fzd4*^{-/-} n'ont pas la capacité de former des branchements semblables aux cellules contrôles. Fzd4 pourrait donc réguler la formation des CE en tubes endothéliaux lors de l'angiogenèse via un contrôle de la signalisation TGF- β puisqu'il régule le nombre de transcripts *TGF- β R2* et permet la réponse TGF- β 1/Smad2 spécialisée dans la différenciation des CE.

Il a été montré que les signalisations Wnt et TGF- β pouvaient réguler réciproquement la production de leurs ligands au cours du développement (Hoppler et al. 1998; Jin et al. 2006; Rodriguez-Esteban et al. 2001). De plus, des études précédentes démontrent une coopération des signalisations Wnt et TGF- β durant l'embryogenèse. Dans les embryons de xénope, les voies Wnt et Smad2 coopèrent pour induire l'expression des gènes *Siamois* et *Xtwn* spécifiques de l'établissement du centre organisateur de Spemann (Crease et al. 1998). Les protéines intracellulaires de ces deux cascades de signalisations transloquent dans le noyau pour participer à la transcription (Nishita et al. 2000). Récemment, l'activation des voies Wnt canonique et non canonique par un ligand de la famille TGF- β a été démontrée lors de

l'angiogenèse (de Jesus Perez et al. 2009). Dans notre étude, nous montrons que le récepteur Fzd4 régule l'expression du récepteur *TGF-βR2* et l'activation de Smad2 par le TGF-β1 dans les CE. Fzd4 serait donc au centre d'une interrelation entre la signalisation Wnt et la signalisation TGF-β pour former le réseau vasculaire.

Enfin, nous avons montré que Fzd4 régule la signalisation du bFGF dans les cellules vasculaires. En effet, la perte de Fzd4 engendre une importante diminution du taux d'ARNm *bFGF* dans les CML. Comme nous l'avons décrit précédemment, le bFGF est impliqué dans les fonctions migratoires des cellules vasculaires. Dans cette étude, nous avons observé que la migration et la polarisation des cellules vasculaires en réponse au bFGF sont altérées suite à la délétion du gène *fzd4*, et que ces défauts fonctionnels semblent être liés à une perte de la réponse Akt/p44/42MAPK/bFGF. Ainsi, suite à cette diminution du taux de bFGF dans les cellules vasculaires *fzd4*^{-/-}, celles-ci ont perdu la capacité à répondre au bFGF en terme de migration.

Cette perte de réponse au bFGF est très importante, et peut expliquer le phénotype vasculaire observé chez les souris *fzd4*^{-/-}. En effet, la stabilité des vaisseaux requiert le recouvrement des néo-tubes endothéliaux formés par les cellules murales. Dans cette étude, nous avons mis en évidence que la délétion de *fzd4* retardait le recouvrement des CE par les cellules périvasculaires α-SMA positives, et amenait à une vascularisation immature dans le rein au stade post natal J5 ; cet effet est partiellement retrouvé à l'âge adulte. Ce défaut pourrait être la conséquence de la diminution drastique du taux de *bFGF* dans les CML, et de la perte des propriétés migratoires et de la polarisation des CML en réponse au bFGF. De manière intéressante, le bFGF montre un puissant effet angiogénique en synergie avec le VEGF-A dans l'induction de la néovascularisation, amenant à la formation de vaisseaux sanguins matures (Kano et al. 2005). Ces données démontrent le rôle de Fzd4 dans la stabilisation et la maturation des vaisseaux par un contrôle de la signalisation du bFGF, et pourraient expliquer la perte des lits capillaires dans les organes périphériques.

Plusieurs études ont montré que les signalisations bFGF et Wnt pouvaient interagir ensemble, et ce, par interrelation entre les composants de ces deux voies (Ciruna et al. 2001; Holnthoner et al. 2002) ou par activation indépendante suite à la régulation des gènes cibles (Zorn et al. 1999). Mais aucune étude n'a montré à ce jour une régulation des voies Wnt et bFGF sur la production de leurs ligands, comme nous le montrons dans cette étude.

Nous avons donc montré *in vitro* que Fzd4 régule différentes voies de signalisation impliquées dans les fonctions angiogéniques des cellules vasculaires. Les signalisations du TGF- β et du bFGF ainsi que le régulateur du cycle cellulaire E2F1 semblent être des cibles du récepteur Fzd4, spécifiques du type cellulaire. Les signalisations TGF- β et bFGF sont des cibles spécifiques de Fzd4 puisque l'on a montré que la voie du PDGF-BB, un puissant facteur de croissance impliqué dans l'angiogenèse, n'est pas altérée dans les cellules *fzd4*^{-/-}. La compréhension des mécanismes moléculaires nécessaire à la régulation de ces voies permettrait de placer le récepteur Fzd4 comme un nouveau système régulateur central de l'angiogenèse.

Enfin, dans cette étude, nous avons étudié l'implication du récepteur Fzd4 dans la formation des vaisseaux des différents organes chez l'adulte, mais nous n'avons pas étudié l'identité du ou des ligands capables d'activer Fzd4 lors de ce processus. Dans la littérature, le ligand Norrin a été associé spécifiquement à l'activation de Fzd4 lors de la vascularisation de la rétine et de l'oreille interne (Xu et al. 2004) ; la délétion du gène *norrin* engendre un phénotype vasculaire proche de celui des souris *fzd4*^{-/-} (Rehm et al. 2002). En revanche, les ligands Wnt impliqués dans l'activation du récepteur Fzd4 lors de la morphogenèse vasculaire n'ont pas été identifiés. Plusieurs ligands de Fzd4 ont déjà été proposés dans différents modèles cellulaires, tels que les ligands Wnt3a dans des cellules neuronales de souris (Bryja et al. 2007) et XWnt8 chez le xénope (Holmen et al. 2005) pour l'activation de la signalisation canonique, et le ligand Wnt5a (Chen et al. 2003) pour l'activation de la voie de PCP dans la lignée de cellules embryonnaires rénales 293TG. Ces différents ligands Wnt sont donc des activateurs potentiels de Fzd4, mais l'identité des ligands Wnt susceptibles d'activer la signalisation induite par Fzd4 au cours de la formation des vaisseaux reste à découvrir.

En conclusion, nous avons identifié un récepteur clé dans la formation et le branchement du réseau artériel vasculaire d'organes périphériques, le récepteur Fzd4. Ce récepteur a déjà été associé au développement vasculaire de la rétine puisque la délétion de *fzd4* chez la souris engendre une altération du réseau vasculaire rétinien secondaire et tertiaire (Xu et al. 2004). Ce phénotype est apparenté à une maladie humaine, la vitréorétinopathie exsudative familiale (FEVR), qui présente des défauts vasculaires rétiniens et est associée à la mutation de *fzd4* (Kondo et al. 2003; Robitaille et al. 2002). La perte ou la mutation de *fzd4* engendre donc des phénotypes similaires dans la rétine respectivement chez la souris et l'homme. Ainsi, le rôle de Fzd4 dans la morphogenèse artérielle chez la souris démontré dans notre étude pourrait

être transposé à l'homme. Un accident vasculaire ischémique pourrait donc avoir des effets délétères plus importants chez des patients souffrant de la maladie de FEVR ; les mécanismes d'adaptation à l'ischémie, à savoir le développement de néo-vaisseaux, seraient diminués par la perte de la fonction angiogénique induite par la mutation de *fzd4*.

III. Résultats préliminaires sur l'étude du partenaire intracellulaire de Fzd4, la protéine centrale Dishevelled3

Nous avons décrit un rôle de Fzd4 dans la morphogenèse vasculaire, mais les mécanismes moléculaires mis en jeu lors de son activation ne sont pas clairs. L'élément central des voies de signalisation Wnt-dépendante est la protéine Dvl. Elle est à la fois nécessaire et suffisante pour transduire les 3 voies de signalisation (Logan et al. 2004). Trois isoformes ont été décrites chez les mammifères : Dvl1, Dvl2 et Dvl3, qui sont toutes les 3 fortement exprimées dans les cellules vasculaires. Les protéines Dvl possèdent 3 domaines hautement conservés : DIX, PDZ, DEP. Le domaine DIX interviendrait plutôt dans la voie canonique, le domaine DEP plutôt dans la voie non-canonique, alors que le domaine PDZ interviendrait dans les deux voies (Axelrod et al. 1998; Boutros et al. 1998; Penton et al. 2002; Rothbacher et al. 2000).

Le mécanisme utilisé par Dvl pour transduire le signal Wnt n'est pas encore clair. Le but de cette étude a été d'analyser la voie de signalisation induite par Fzd4 via Dvl dans les cellules vasculaires afin de comprendre les mécanismes mis en jeu lors de son activation. Notre hypothèse est que l'isoforme 3 de Dvl serait impliquée dans la voie de signalisation induite par Fzd4 dans les cellules vasculaires. C'est pourquoi une étude comparative entre les 3 isoformes de Dvl a débuté et présente à ce jour quelques résultats préliminaires. De plus, la compréhension des mécanismes mis en jeu par l'activation de Fzd4 dans les cellules vasculaires passe aussi par la recherche de partenaires intracellulaires. Un double hybride a ainsi été réalisé avec l'isoforme 3 de Dvl, sélectionnant plusieurs gènes candidats susceptibles d'interagir avec Dvl3 lors de l'activation de la signalisation.

A. Résultats préliminaires sur l'analyse du partenariat entre Fzd4 et les isoformes de Dvl

1. Localisation de Dvl1, Dvl2 et Dvl3

a) Localisation des 3 isoformes de Dvl sous Fzd4

L'activation des voies Wnt nécessite le recrutement de Dvl à la membrane (Boutros et al. 1999; Lee et al. 1999), en liant la queue intracytoplasmique de Fzd via son domaine PDZ (Wong et al. 2003). Nous avons donc étudié par immunofluorescence la localisation des 3 isoformes de Dvl sous la surexpression de Fzd4 afin d'analyser si ce récepteur induit la relocalisation membranaire des Dvl.

La surexpression de Dvl1, 2 et 3 montre une localisation des 3 isoformes de Dvl en amas cytoplasmiques (**Figure 69**). La littérature montre que cette localisation punctiforme est réalisée via le domaine DIX de Dvl (Schwarz-Romond et al. 2007; Yang-Snyder et al. 1996).

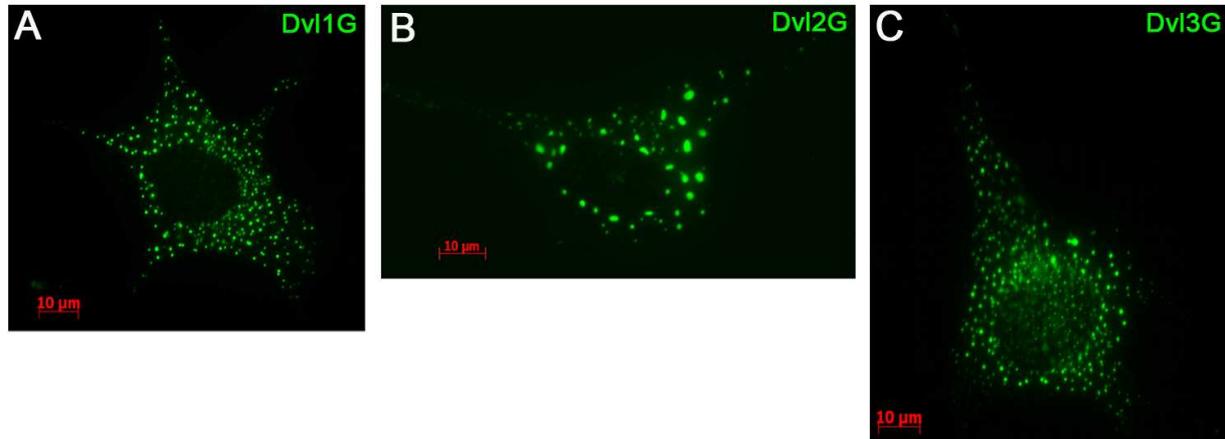


Figure 69 : Localisation punctiforme des 3 isoformes de Dvl

Analyse par immunofluorescence de la localisation de Dvl1G (A), Dvl2G (B) et Dvl3G (C) surexprimés dans les cellules 3T3 (en vert).

Lorsque l'on surexprime Fzd4, on observe un changement de localisation des 3 isoformes de Dvl (**Figure 70**). La surexpression de Fzd4 induit une relocalisation des isoformes 1 et 3 de Dvl, pour lesquels les amas cytoplasmiques semblent se dissocier. L'expression de Dvl2, elle, est à la fois en amas et diffuse sous la surexpression de Fzd4. Ces données montrent un effet plus spécifique de Fzd4 sur la relocalisation de Dvl1 et Dvl3.

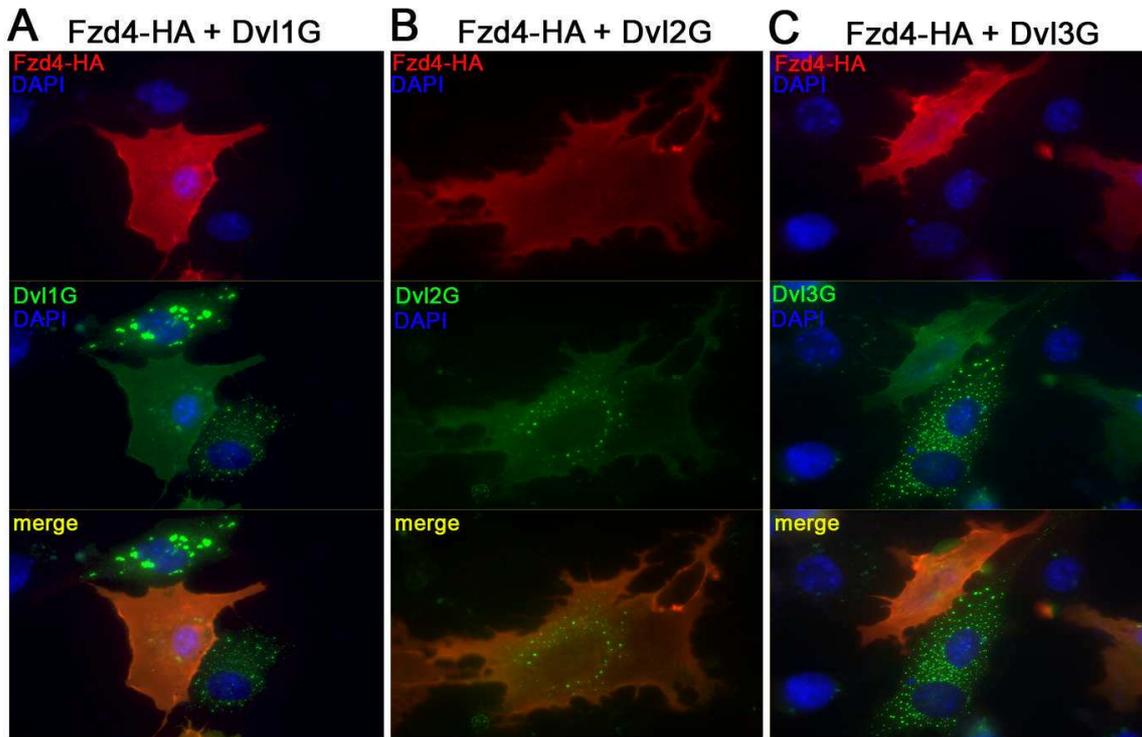


Figure 70 : Localisation de Dvl1, Dvl2 et Dvl3 sous la surexpression de Fzd4

Analyse par immunofluorescence de la localisation de Dvl1G (A), Dvl2G (B) et Dvl3G (C) (en vert) cotransfectés avec Fzd4-HA (en rouge) dans les cellules 3T3. Les noyaux sont colorés en bleu (DAPI).

Par des analyses de microscopie confocale, nous avons pu mettre en évidence que sous Fzd4, la relocalisation de Dvl1 et 3 est membranaire. Dvl1 et Dvl3 colocalisent avec Fzd4 en certains endroits de la membrane plasmique (**Figure 71**). Cette colocalisation suggère une éventuelle interaction entre Fzd4 et Dvl1, et Fzd4 et Dvl3, nécessaire à l'activation des voies de signalisation.

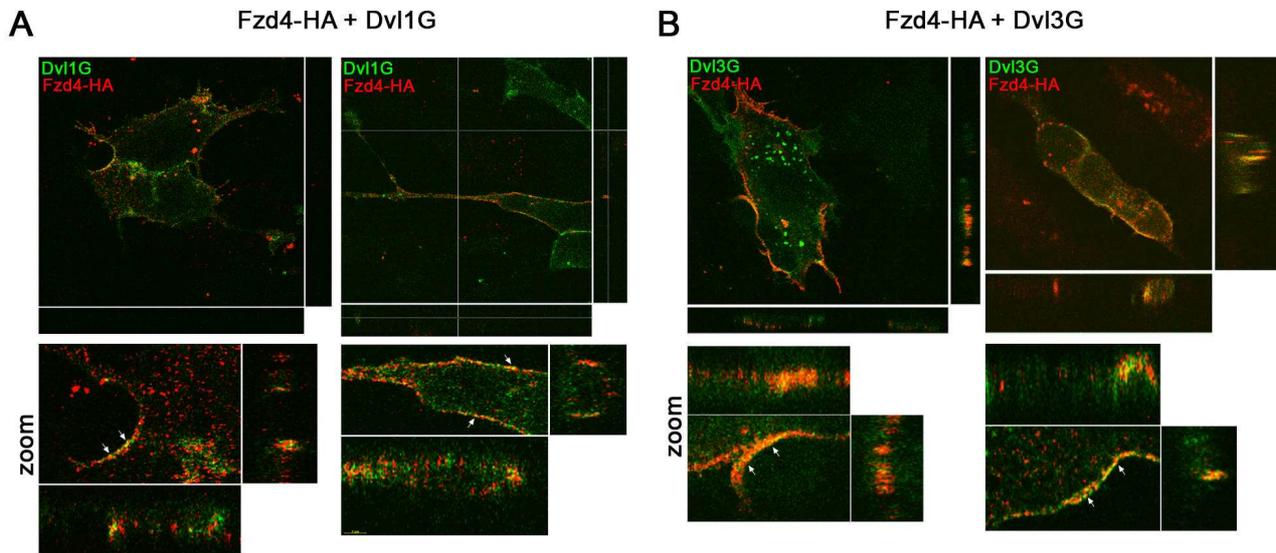


Figure 71 : Localisation de Dvl1 et Dvl3 sous la surexpression de Fzd4

Analyse confocale de la localisation de Dvl1G (A) et Dvl3G (B) (en vert) cotransfectés avec Fzd4-HA (en rouge) dans les cellules 3T3.

En contrôle, nous avons utilisé une construction exprimant la protéine Fzd4 déletée de sa partie intracellulaire (Fzd4-CRD). En effet, le recrutement de Dvl à la membrane dans l'activation des voies Wnt nécessite une liaison de Dvl à la queue intracytoplasmique de Fzd (Wong et al. 2003). Nous avons donc vérifié que la surexpression de Fzd4-CRD n'induisait pas de relocalisation membranaire des Dvl. A ce jour, seule la localisation de l'isoforme Dvl3 a été analysée. Les premiers résultats ont mis en évidence que la surexpression de Fzd4-CRD n'induisait pas de diffusion des amas cytoplasmiques de Dvl3, et donc de relocalisation membranaire de cet isoforme (**Figure 72**). Le domaine CRD seul de Fzd4 n'est donc pas suffisant pour relocaliser Dvl3 à la membrane, démontrant que la partie intracellulaire de Fzd4 est indispensable dans ce processus.

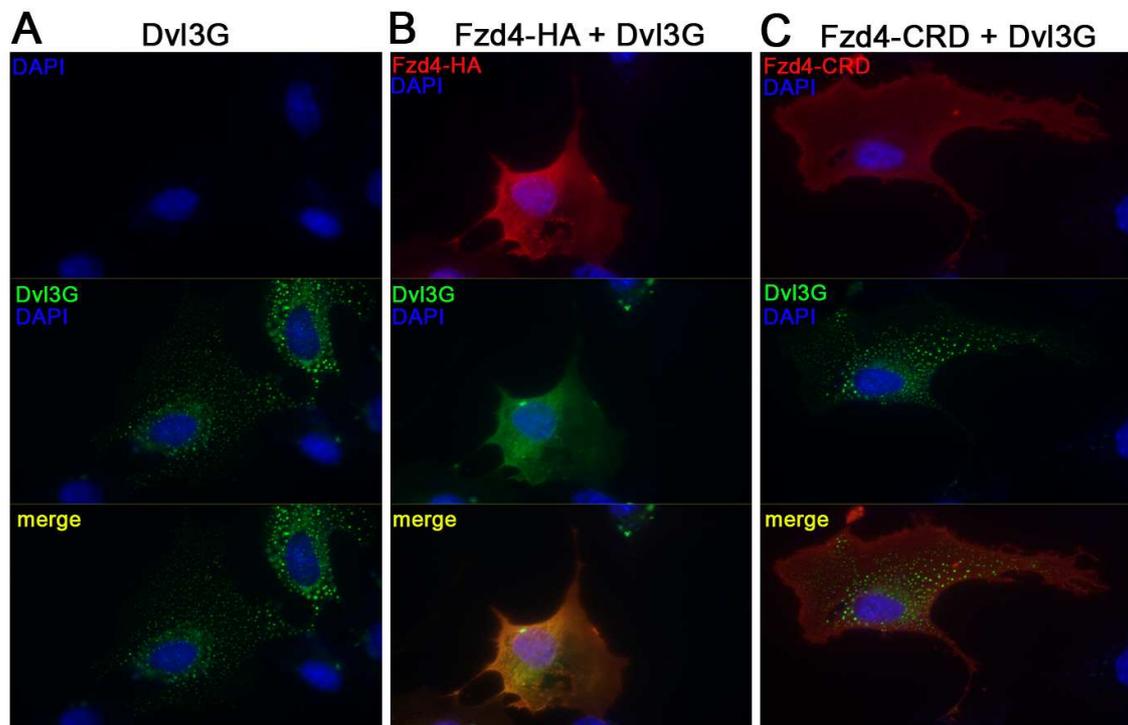


Figure 72 : Localisation de Dvl3 sous la surexpression de Fzd4 déleté ou non de sa partie intracellulaire

Analyse par immunofluorescence de la localisation de Dvl3G (en vert) surexprimé seul (A), ou cotransfecté avec Fzd4-HA (B) ou avec Fzd4-CRD (C) (en rouge) dans les cellules 3T3. Les noyaux sont colorés en bleu (DAPI).

b) Localisation des 3 isoformes de Dvl sous Fzd7

La relocalisation des 3 isoformes de Dvl a été étudiée sous la surexpression d'un autre Fzd, Fzd7, afin de savoir si cet isoforme engendre la même réponse que Fzd4. Dans la **figure 73**, on constate que Dvl1, 2 et 3 restent en amas cytoplasmiques sous la surexpression de Fzd7. La dissociation des amas de Dvl1 et Dvl3 est partielle comparée à celle engendrée par la surexpression de Fzd4 (**Figure 70**). La localisation de Dvl2, elle, est similaire sous la surexpression de Fzd4 ou de Fzd7.

Ainsi, il semblerait que la relocalisation membranaire de Dvl1 et Dvl3 soit plutôt engendrée par la surexpression de Fzd4, suggérant une spécificité d'interaction de Dvl1 et Dvl3 avec Fzd4 plutôt qu'avec Fzd7.

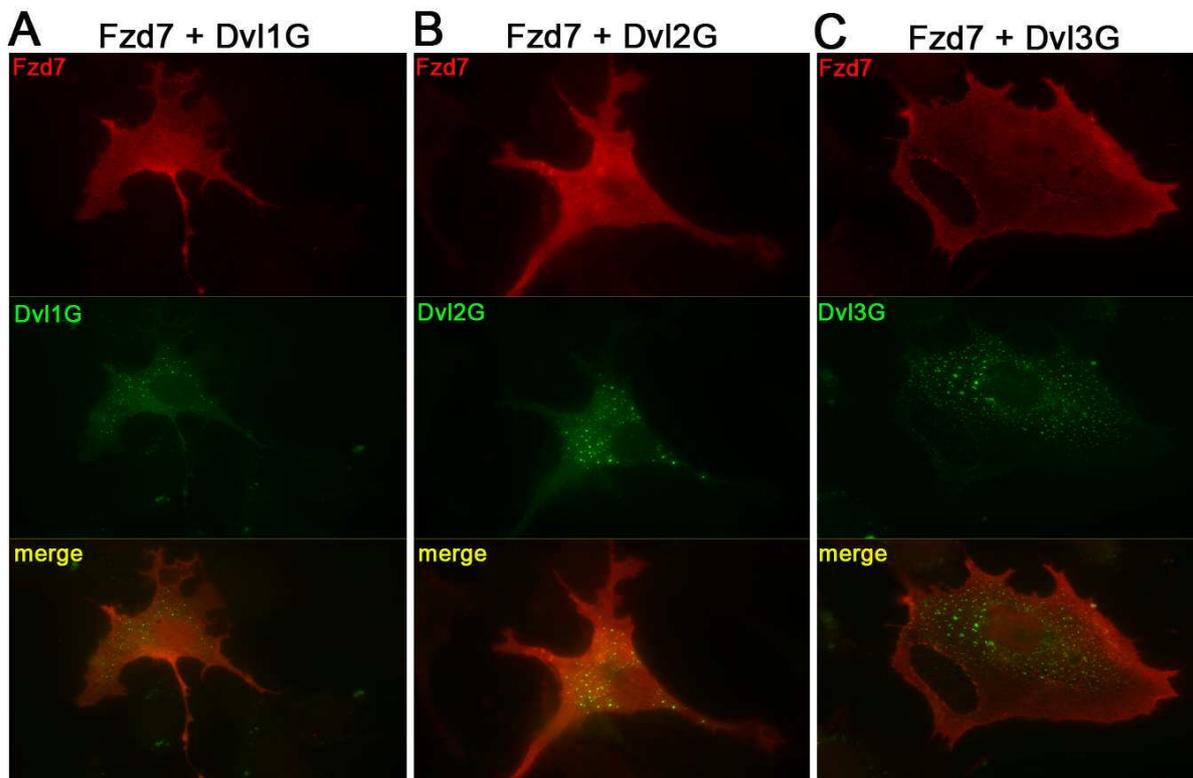


Figure 73: Localisation de Dvl1, Dvl2 et Dvl3 sous la surexpression de Fzd7

Analyse par immunofluorescence de la localisation de Dvl1G (A), Dvl2G (B) ou Dvl3G (C) (en vert) cotransfectés avec Fzd7 (en rouge) dans les cellules 3T3.

Ces résultats préliminaires suggèrent que Fzd4 induit une relocalisation membranaire de Dvl1 et Dvl3, nous amenant à nous intéresser à ces isoformes dans l'étude d'un partenariat avec Fzd4 dans l'activation des voies Wnt dans les cellules vasculaires.

2. Analyse du partenariat Fzd4-Dvl dans l'activation de la voie canonique

a) Activation de la voie canonique sous Fzd4 et Dvl1/3

Une des voies de signalisation du système Wnt/Fzd est la voie canonique, dépendante de la β -caténine. Le système rapporteur Super 8X TOP/Flash est spécifique de l'activation de cette voie puisqu'il rapporte la transactivation de la β -caténine. Nous avons utilisé ce système rapporteur afin d'étudier le rôle des isoformes 1 et 3 de Dvl dans l'activation de la voie canonique avec Fzd4.

Dans la **figure 74**, l'addition de LiCl, utilisé comme contrôle, induit une forte activité luciférase ($x14 \pm 6$), démontrant que le système est fonctionnel, et que la voie canonique peut être activée dans les cellules 293TG.

En premier lieu, nous constatons que les isoformes 1 et 3 de Dvl sont capables après surexpression d'activer le système rapporteur à eux seuls, avec un taux d'activation deux fois plus important pour Dvl3. En effet, Dvl1 induit une activation de la voie de 5.6 ± 2 fois, alors que Dvl3 active la voie de 13 ± 3 fois.

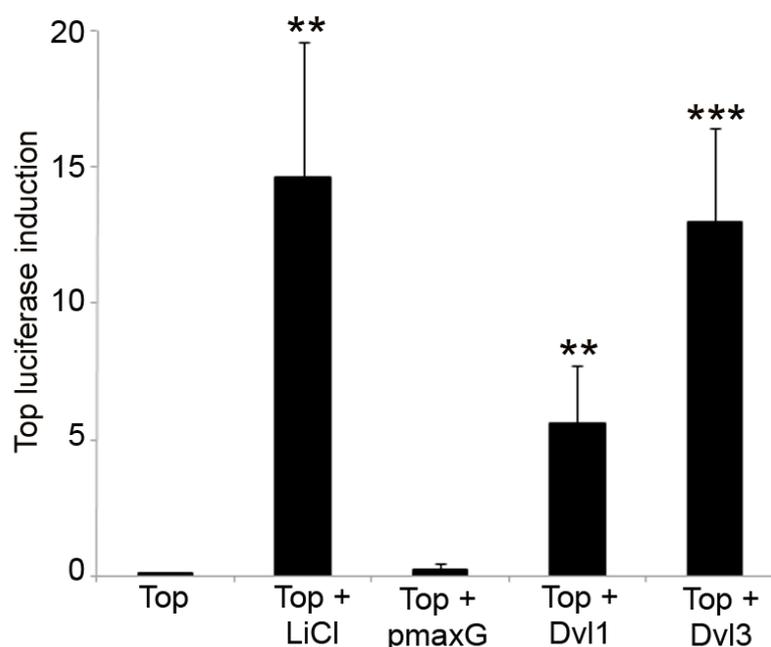


Figure 74 : Activation de la voie canonique sous la surexpression des isoformes 1 et 3 de Dvl

Analyse de l'activation du système Super 8X TOP/Flash après traitement au Chlorure de Lithium (LiCl), ou après surexpression de pmaxG, Dvl1G ou Dvl3G dans les cellules 293TG.

** , $p < 0.005$; *** , $p < 0.001$

Ensuite, l'implication de Dvl1 et Dvl3 avec Fzd4 a été étudiée dans l'activation de la voie canonique, afin de mettre en évidence un partenariat entre Fzd4 et ces isoformes. La cotransfection des isoformes 1 ou 3 de Dvl avec Fzd4 induit une augmentation significative de l'activation de la voie canonique par rapport à la transfection de Dvl1 ou 3 seuls (**Figure 75**), suggérant qu'il existerait un partenariat entre Dvl1 et Fzd4, et Dvl3 et Fzd4 pour activer cette voie.

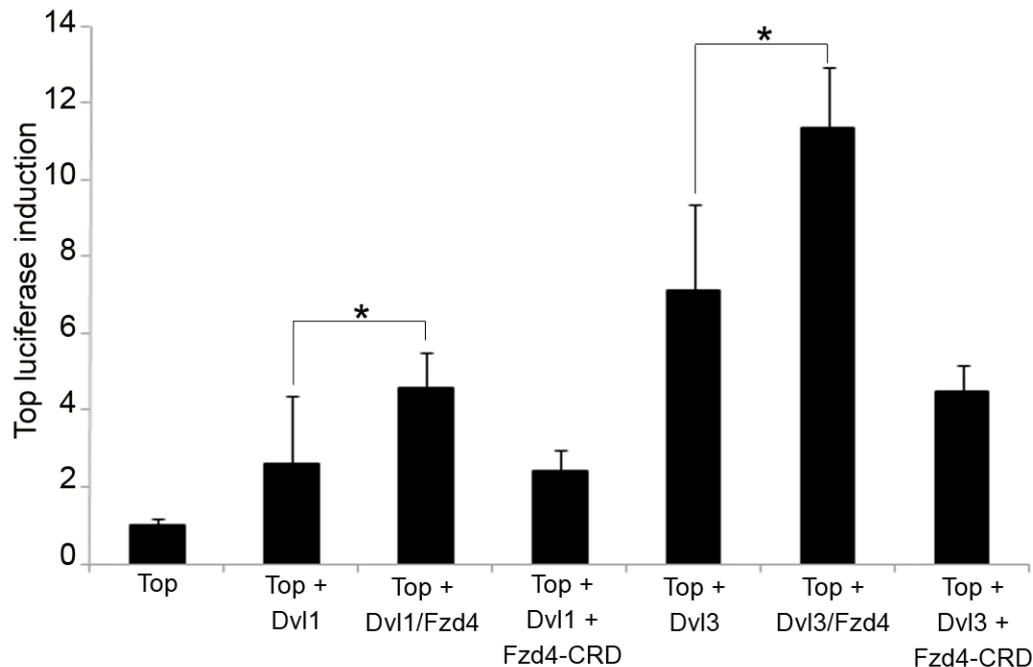


Figure 75 : Activation de la voie canonique sous la surexpression des isoformes 1 et 3 de Dvl avec Fzd4 délété ou non de sa partie intracytoplasmique

Analyse de l'activation du système Super 8X TOP/Flash après cotransfection de Dvl1G ou Dvl3G avec Fzd4-HA ou Fzd4-CRD dans les cellules 293TG.

*, $p < 0.05$

En contrôle, nous avons vérifié que Fzd4 délété de sa partie intracytoplasmique (Fzd4-CRD) ne pouvait pas activer la signalisation Wnt comme le récepteur Fzd4 complet. En effet, ce motif intracytoplasmique serait nécessaire à l'activation de la voie canonique (Umbhauer et al. 2000). D'après la **figure 75**, on observe bien une perte de l'activation du système avec Fzd4-CRD, que ce soit avec Dvl1 ou Dvl3. Le domaine intracytoplasmique de Fzd4 est donc bien indispensable à l'activation de la voie canonique dépendante de Dvl1 ou Dvl3.

En contrôle, nous avons également utilisé une construction Dvl déletée de son domaine DIX (Dvl Δ DIX), domaine connu pour être impliqué dans l'activation de la voie canonique (Kishida et al. 1999; Penton et al. 2002). D'après la **figure 76**, la délétion du domaine DIX de Dvl3 empêche l'activation du système rapporteur de la voie canonique. La cotransfection des cellules avec Fzd4 et Dvl3 Δ DIX n'induit donc pas la voie comme avec la forme sauvage de Dvl3, démontrant que le domaine DIX est indispensable à l'activation de la voie canonique.

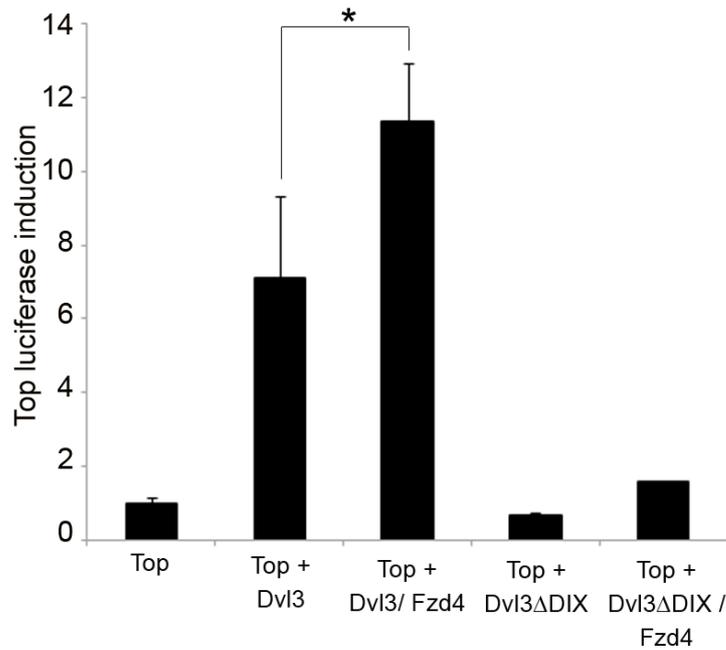


Figure 76 : Activation de la voie canonique sous la surexpression de Dvl3 délété ou non de son domaine DIX avec Fzd4

Analyse de l'activation du système Super 8X TOP/Flash après cotransfection de Dvl3G ou Dvl3 Δ DIXG avec Fzd4-HA dans les cellules 293TG.

*, $p < 0.05$

a) Activation de la voie canonique sous Fzd7 et Dvl3

Nous avons montré que la relocalisation membranaire de Dvl1 et Dvl3 était plutôt engendrée par la surexpression de Fzd4 que par celle de Fzd7. Cette relocalisation est nécessaire dans l'activation de la voie canonique (Boutros et al. 1999). C'est pourquoi nous avons voulu analyser l'activation de cette voie sous la surexpression de Fzd7 afin de voir si Fzd7 induit une activation de la voie canonique comparable à celle engendrée par Fzd4. Cette étude a été réalisée à ce jour qu'avec Dvl3.

Dans la **figure 77**, nous observons que comme pour Fzd4, Fzd7 n'active pas à lui-seul le système rapporteur. En revanche, à la différence de Fzd4, la cotransfection de Dvl3 avec Fzd7 n'induit pas d'augmentation significative de l'activation de la voie canonique. Ce résultat est un bon contrôle et suggère que Dvl3 n'agit pas de la même manière avec tous les Fzd. Dvl3 aurait une spécificité d'action avec certains Fzd, et notamment avec Fzd4.

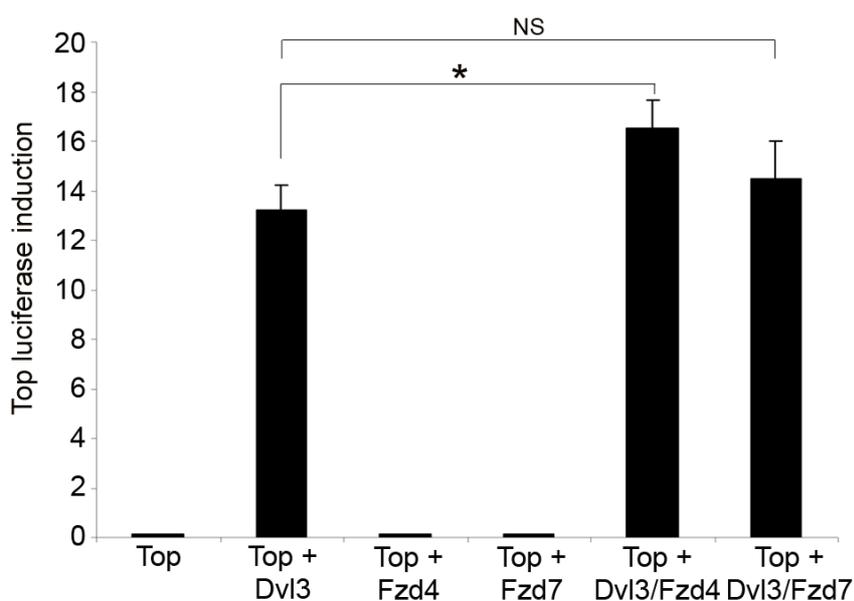


Figure 77 : Activation de la voie canonique sous la surexpression de Dvl3 avec Fzd4 ou Fzd7

Analyse de l'activation du système Super 8X TOP/Flash après transfection de Dvl3G, Fzd4-HA ou Fzd7 seul, ou après cotransfection de Dvl3G avec Fzd4-HA ou Fzd7 dans les cellules 293TG.

NS, non significatif ; *, $p < 0.005$

3. Analyse de l'implication du domaine DIX de Dvl3 dans son interaction avec Fzd4

Dvl est une protéine à 3 domaines conservés : DIX, DEP et PDZ. Plusieurs études ont montré que Dvl active les voies de signalisation Wnt par le biais de ses différents domaines (Li et al. 1999) ; cependant le mécanisme n'est pas encore clair.

Nous nous sommes intéressés à l'implication de ces domaines dans la relocalisation membranaire de Dvl1 et Dvl3 sous Fzd4. Pour cela, des constructions de Dvl délétées de chaque domaine sont nécessaires. Seule l'étude du domaine DIX de Dvl3 a été réalisée à ce jour.

D'après le **figure 78**, Dvl3 délété de son domaine DIX (Dvl3GΔDIX) se localise au niveau du cytoplasme, mais n'est plus en amas punctiformes du fait de la perte du domaine DIX. Il se retrouve plutôt sous la forme d'un unique amas cytoplasmique de localisation périnucléaire.

La surexpression de Fzd4 induit quand même la relocalisation de Dvl3GΔDIX à la membrane, avec une colocalisation entre ces deux partenaires en quelques points membranaires (**Figure 78**). Le domaine DIX de Dvl ne semble donc pas nécessaire à la relocalisation de Dvl3 à la membrane plasmique.

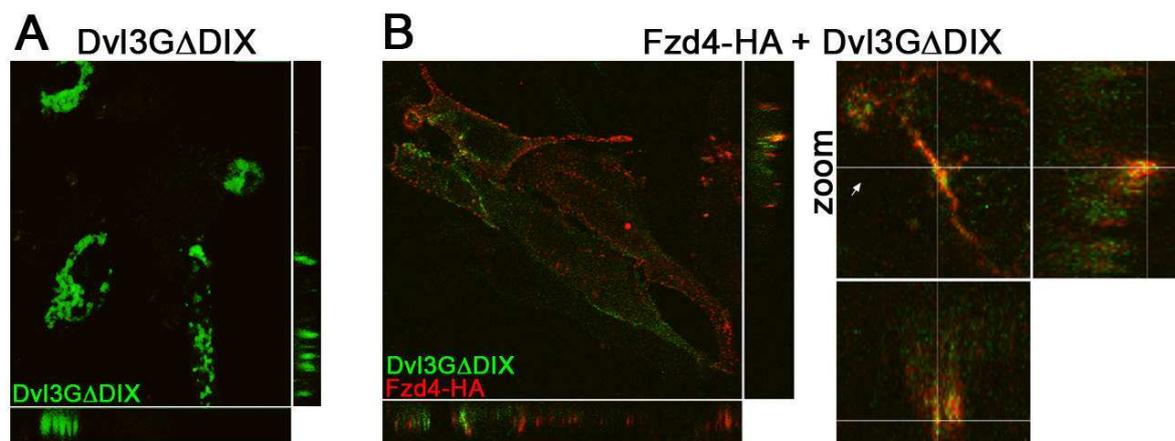


Figure 78 : Localisation de Dvl3 délété de son domaine DIX sous la surexpression de Fzd4

Analyse confocale de la localisation de Dvl3ΔDIX (en vert) surexprimé seul (A) ou cotransfecté avec Fzd4-HA (en rouge) (B) dans les cellules 3T3.

B. Perspective de recherche des partenaires intracellulaires de Dvl3

Dvl3 participe à l'activation des différentes voies de signalisation Wnt par le biais de ses différents domaines. Il active la voie canonique (Lee et al. 2008), mais est aussi capable de contrôler les voies non canoniques (Etheridge et al. 2008). Pour étudier les mécanismes d'action de Dvl3 dans l'activation des différentes voies Wnt, nous avons décidé de nous focaliser sur l'étude du domaine DEP, plutôt impliqué dans l'activation des voies non canoniques, et du domaine PDZ, plutôt impliqué dans les voies canonique et non canonique (Boutros et al. 1999) et spécialisé dans les interactions protéine-protéine. Comme la compréhension du mécanisme d'action de Dvl3 dans la régulation des voies Wnt passe aussi par la recherche de ses partenaires intracellulaires, un criblage d'une banque d'ADNc d'embryon de souris (11,5 dpc) mené avec la forme de Dvl3 délété du domaine DIX a été réalisé dans le laboratoire (par Béatrice Vinassa) par une méthode de double hybride chez la levure. Trois cent clones ont ainsi été obtenus, parmi lesquels nous avons sélectionné certains gènes candidats suivant leur fonction et leur potentialité à interagir avec Dvl3. On les classe en 4 groupes de gènes (**Tableau 21**).

Groupes de gènes	Clones	Gènes candidats
Protéines associées aux microtubules	29	Mus musculus microtubule associated serine/threonine kinase 2 (Mast2), transcript variant 2
	229	Mus musculus stathmin-like 2 (Stmn2)
	500	Mus musculus kinesin family member 26B (Kif26b)
Transport intracellulaire	31	Mus musculus Niemann Pick type C2 (Npc2)
	138	Mus musculus syntaxin 8 (Stx8)
Cycle cellulaire	19	Mus musculus cell division cycle associated 8 (Cdca8)
	47	Mus musculus large tumor suppressor (Lats1)
	78	Mus musculus E2F transcription factor 7 (E2f7)
Autres	61	Mus musculus Notch gene homolog 1 (Drosophila) (Notch1)
	62	Mus musculus homeodomain interacting protein kinase 1 (Hipk1)
	258	Mus musculus vang-like 2 (van gogh, Drosophila) (Vangl2)

Tableau 21 : Candidats sélectionnés susceptibles d'interagir avec Dvl3 délété de son domaine DIX

Analyse de la recherche des partenaires intracellulaires de Dvl3 délété du domaine DIX par criblage d'une banque d'ADNc d'embryon de souris (11,5 dpc) par une méthode de double hybride chez la levure. Quatre groupes de gènes candidats ont été sélectionnés parmi les 300 clones obtenus.

C. Conclusions et perspectives

1. Partenariat entre Fzd4 et les isoformes 1 et 3 de Dvl

D'après les premiers résultats de cette étude, nous avons observé que la surexpression de Fzd4 induit la dissociation des amas cytoplasmiques de Dvl, en le relocalisant du cytosol à la membrane. Cet effet est plutôt spécifique pour les isoformes 1 et 3 de Dvl, qui se retrouvent colocalisés avec Fzd4 en certains endroits de la membrane plasmique. Cette colocalisation suggère que Fzd4 interagirait avec Dvl1 et Dvl3 à la membrane. Fzd7 n'a pas autant d'impact sur la relocalisation membranaire de ces isoformes, suggérant qu'il existerait une spécificité d'action entre Fzd4 et Dvl1 ou Fzd4 et Dvl3.

La relocalisation membranaire de Dvl et son interaction avec Fzd est nécessaire à l'activation des voies canonique et non canonique (Boutros et al. 1999; Lee et al. 1999). Nous avons étudié l'implication des isoformes 1 et 3 de Dvl dans l'activation de la voie canonique grâce à un système rapporteur. Nous avons constaté que chacun de ces deux isoformes induit à lui seul la voie Wnt/ β -caténine. De plus, la cotransfection avec Fzd4 augmente significativement l'activation de cette voie, montrant une synergie d'action entre Dvl1 et Fzd4, et Dvl3 et Fzd4 dans l'activation de la voie canonique. Ce partenariat semble être spécifique pour Dvl3 puisque cet effet n'est pas retrouvé avec Fzd7. Il serait intéressant d'étudier la relocalisation membranaire de ces isoformes ainsi que l'activation de la voie canonique avec des récepteurs Fzd de la même famille que le récepteur Fzd4, à savoir Fzd9 et Fzd10, afin de voir si le fait de partager 65% d'identité leur confère les mêmes propriétés d'interactions et d'activation des voies de signalisation (Fredriksson et al. 2003).

La spécificité entre Fzd4 et les isoformes de Dvl n'est pas très connue. Une étude a montré une interaction directe entre Dvl2 et Fzd4 (Chen et al. 2003) dans l'induction de la voie de la polarité planaire (Yu et al. 2007). En revanche, aucune interaction n'a été montrée entre Dvl1 et Fzd4, ou entre Dvl3 et Fzd4. Seule la participation de Fzd4 et Dvl3 avait été décrite lors de la prolifération cellulaire, mais via l'activation de la voie non canonique (Masckauchan et al. 2006). Dans cette étude, aucun lien direct entre Fzd4 et Dvl3 n'a été montré. Donc l'induction de la voie canonique par Fzd4 et Dvl1 ou Dvl3 serait une première démonstration de leur partenariat dans l'activation de cette voie. De plus, pour confirmer ce partenariat, il faudrait analyser leur interaction physique potentielle par un test d'immunoprécipitation.

Pour comprendre le mécanisme par lequel Dvl induit telle ou telle voie de signalisation, l'analyse des différents domaines de Dvl dans la relocalisation de Dvl et l'activation des voies

est nécessaire. Nous avons observé que Dvl3 délété de son domaine DIX n'active pas le système rapporteur de la voie canonique, confirmant le rôle de ce domaine dans l'activation de cette voie (Kishida et al. 1999; Penton et al. 2002). En revanche, le domaine DIX ne semble pas être nécessaire pour la relocalisation membranaire de l'isoforme 3 de Dvl sous Fzd4. Il n'est pas non plus nécessaire pour sa colocalisation avec Fzd4 au niveau de la membrane. Ceci conforte l'étude de Wong et al. qui a montré que le recrutement à la membrane de Dvl se fait via son domaine PDZ qui se lie à la queue intracytoplasmique de Fzd (Wong et al. 2003). Cette étude sera complétée par l'analyse des autres domaines des isoformes 1 et 3 de Dvl. Elle nécessite l'utilisation et donc la construction des formes de Dvl1 et Dvl3 délétées des autres domaines afin de comprendre les mécanismes d'activation de cette voie canonique sous Fzd4.

D'après ces premiers résultats, ce sont les isoformes Dvl1 et Dvl3 qui semblent être impliqués dans la signalisation engendrée par Fzd4. Ces données vont dans le sens de notre hypothèse qui était que Dvl3 serait impliquée dans la voie de signalisation induite par Fzd4 dans les cellules vasculaires. Mais elles démontrent également l'implication de Dvl1 dans ce processus. Dvl1 et Fzd4 ou Dvl3 et Fzd4 agiraient ensemble pour activer la voie Wnt/ β -caténine dans les cellules. Ces partenariats potentiels seront à analyser lors de la prolifération cellulaire, et d'autant plus dans les cellules endothéliales, puisque nous avons montré dans l'étude précédente que Fzd4 a un impact sur la croissance de ces cellules. Dvl1 et Dvl3 pourraient donc aussi participer à la signalisation induite par Fzd4 dans les CE. Cette signalisation est à éclaircir car nous avons aussi démontré que la diminution de la prolifération des CE suite à la perte de *fzd4* était aussi liée à une signalisation E2F1 inhibée. Il faudrait étudier le rôle de Dvl1 et Dvl3 sur E2F1 dans la progression du cycle cellulaire des CE, et établir un lien entre les signalisations Fzd4/Dvl1 ou Fzd4/Dvl3 et E2F1.

2. Recherche de partenaires intracellulaires de Dvl3

La sélection des gènes candidats parmi les 300 clones obtenus par le double hybride réalisé avec la forme Dvl3 Δ DIX s'est basée sur la fonction de ces gènes. En effet, la signalisation et la régulation du système Wnt/Fzd sont complexes et mettent en jeu divers processus intracellulaires comme le trafic vésiculaire ou la réorganisation du cytosquelette par exemple. C'est pourquoi les gènes impliqués dans ces processus nous ont paru intéressants à analyser, d'autant plus que pour certains, une interrelation avec la signalisation Wnt a déjà été observée.

En ce qui concerne les protéines associées aux microtubules, ce sont les gènes qui codent pour les protéines Microtubule associated serine-thrénine kinase 2 (Mast2), Stathmin-like 2 (Stm2) et Kinesin family member 26B (Kif26b) qui attirent notre attention. En effet, Mast2 est une kinase qui a un rôle dans la régulation de divers processus, comme la croissance cellulaire et l'apoptose, ou dans la régulation de la fonction des organes tel que le rein. Elle peut interagir avec diverses molécules via son domaine PDZ pour les réguler par phosphorylation, comme avec le suppresseur de tumeurs PTEN (Valiente et al. 2005) ou l'échangeur Na⁺/H⁺ NHE3 (Wang et al. 2006). Mast2 serait donc un partenaire potentiel pour Dvl3 pour la régulation des mouvements du cytosquelette lors des voies non canoniques Wnt. Stmn2 est une protéine associée à la croissance des neurones. Cependant, son expression n'est pas confinée qu'aux cellules neurales ; on la retrouve aussi exprimée dans les cellules souches mésenchymateuses humaines, notamment au niveau du Golgi (Chiellini et al. 2008). Elle est connue pour inhiber la polymérisation des microtubules en les déstabilisant par phosphorylation. Un rôle croisé entre Stmn2 et la signalisation Wnt a été montré dans les cellules hépatiques, où le gène *Stmn2* serait activé par la transcription induite par la voie Wnt/ β -caténine (Lee et al. 2006). Stmn2 jouerait un rôle dans la régulation de la dynamique des microtubules dépendante de la voie Wnt lors de la tumorigénèse du foie. Son interaction avec Dvl3 serait également intéressante pour les mouvements dans la cellule.

Kif26b est un des membres de la famille des kinésines. Cette isoforme a été très peu étudiée par rapport aux autres membres de la famille. Les kinésines Kif sont des protéines motrices le long des microtubules, jouant un rôle dans diverses fonctions cellulaires telles que la mitose, et dans le transport de molécules comme lors du transport axonal, de composants intracellulaires comme les vésicules et des organelles comme la mitochondrie. Différents liens entre les membres de la famille kif et ceux de la voie Wnt ont été établis, notamment durant la rotation corticale des œufs de xénope (Weaver et al. 2003) ou lors de la transduction du

signal Wnt au niveau du cil primaire des cellules (Corbit et al. 2008), mais aucune interaction directe entre un des membres de la famille Kif et Dvl n'a été rapportée. Cependant, il a été montré que l'isoforme Kif1b α possédait un domaine de liaison au domaine PDZ, pouvant ainsi lier certaines protéines à domaine PDZ comme les protéines synaptiques SAP90 et SAP97 (PSD-95/synapse-associated protein-90/97) (Mok et al. 2002). Kif26b pourrait ainsi lier Dvl3 via ce domaine.

En ce qui concerne les protéines impliquées dans le transport intracellulaire, la Syntaxin 8, un des isoformes de la famille Syntaxine, nous a paru intéressante. C'est une protéine qui appartient au complexe SNARE, et qui participe au processus d'exocytose des vésicules synaptiques via son interaction avec un des composants de ce complexe, la synaptotagmine (Syt). Dvl est connu pour participer à la synaptogenèse. Il interagit avec la Syt, et inhibe sa liaison à l'isoforme syntaxin-1A et à SNAP25, un autre composant du complexe d'endocytose et d'exocytose (Kishida et al. 2007). Dvl est donc impliqué dans la régulation de ce processus, mais aucune interaction entre la syntaxin et Dvl n'a encore été rapportée. C'est pourquoi ces deux partenaires sont susceptibles d'interagir ensemble.

Une autre protéine impliquée dans le transport des molécules via le système endosomal/lysosomal a été sélectionnée : Niemann Pick type C2 (Npc2). Npc2 est lié à la maladie Niemann-Pick Type C, qui présente un défaut dans le système de transport moléculaire induisant une accumulation de cholestérol et de glycolipides dans les lysosomes. La fonction de cette protéine dans le transport moléculaire fait de Npc2 un gène d'intérêt.

Pour sélectionner les gènes candidats, nous nous sommes aussi intéressés aux protéines contrôlant le cycle cellulaire. En effet, la signalisation canonique est plutôt impliquée dans la prolifération cellulaire. Les protéines contrôlant le cycle cellulaire sont donc de bons candidats dans la compréhension de cette voie. La protéine Cell division cycle associated 8 (Cdc8) est un composant du complexe chromosomique requis dans la stabilité de la bipolarité du fuseau mitotique (Gassmann et al. 2004). Il fait donc parti des régulateurs clé des événements mitotiques.

La protéine Large tumor suppressor, homolog 1 (Lats1) est une kinase serine/thréonine qui intervient dans le contrôle du cycle cellulaire avec la kinase Cdc2 durant les 1ères phases de la mitose. Elle peut se lier aux protéines à domaine PDZ, puisqu'elle interagit avec la protéase proapoptotique mitochondriale Omi (Kuninaka et al. 2005). Lats1 est donc impliquée à la fois dans la régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose, et est susceptible d'interagir avec Dvl3.

Enfin, E2F7 (E2F transcription factor 7) est un facteur de transcription appartenant à la famille E2F, qui a une activité répressive sur la régulation du cycle cellulaire. Comme il est décrit dans la partie annexe « E2F1 dans le cycle cellulaire », les systèmes pRb/E2F et Wnt/ β -caténine sont deux voies de signalisations liées, les plus fréquemment dérégulées dans les cancers humains. Aucun lien entre le facteur de transcription répresseur E2F7 et la signalisation Wnt n'a été établi à ce jour. Comme nous avons montré dans cette étude un lien entre Fzd4 et E2F1 dans le contrôle du cycle cellulaire des CE, E2F7 nous paraît être un gène candidat d'intérêt.

Enfin, nous avons aussi porté un intérêt à d'autres protéines pour lesquelles il a déjà été démontré leur interaction avec Dvl, telles que la protéine Notch1, une protéine transmembranaire de la famille Notch qui intervient dans de nombreux processus développementaux en contrôlant le devenir des cellules. Les signalisations Wnt et Notch coopèrent ensemble pour réguler certaines de ces fonctions. Il a été montré que Notch pouvait interagir avec Dvl (Axelrod et al. 1996; Blair 1996) et que cette liaison bloquait la signalisation de Notch, c'est pourquoi une interaction entre Dvl3 et Notch1 serait fortement probable et renseignerait sur le domaine de Dvl impliqué dans cette liaison.

La protéine Homeodomain interacting protein kinase 1 (Hipk1) est une kinase sérine/thréonine nucléaire, identifiée pour interagir avec les protéines à homéodomaine. Elle est liée aux mouvements cellulaires durant la gastrulation et la fermeture du tube neural, mais aussi durant l'hématopoïèse, l'angiogenèse et la vasculogenèse chez la souris (Isono et al. 2006). Récemment, son interaction avec Dvl a été prouvée pour la première fois chez le xénope (Louie et al. 2009). Hipk1 est donc un bon candidat et son interaction avec Dvl3 devrait être confirmée. Cependant, dans cette étude, cette interaction impliquait le domaine DIX de Dvl. Dans notre étude, cette interaction éventuelle impliquerait un autre domaine de Dvl, et donc un autre mécanisme de régulation.

Enfin, la protéine Van-Gogh like 2 (Vangl2) est une protéine membranaire à multiples domaines PDZ connue pour intervenir dans la voie PCP (Montcouquiol et al. 2003), notamment dans l'établissement de la polarité des ommatidies des yeux et des soies des ailes chez la drosophile (Kibar et al. 2001; Wolff et al. 1998). Vangl2 peut interagir avec Dvl (Bastock et al. 2003). Cette interaction semble nécessiter la partie cytoplasmique Cterminale de Vangl2, et les domaines DIX et PDZ de Dvl (Torban et al. 2004). Ici, le domaine DIX ne peut pas être impliqué dans cette interaction.

Parmi les gènes candidats, certains partenaires sélectionnés n'ont pas fait l'étude d'interaction directe avec Dvl, mais néanmoins ont été liés avec la voie Wnt. La mise en évidence d'une interaction entre ces partenaires pourrait donc améliorer la compréhension du mécanisme d'action de Dvl3 dans la régulation des voies Wnt. C'est le cas pour la syntaxin 8 (Kishida et al. 2007), Stmn2 (Lee et al. 2006) et Kif26b (Corbit et al. 2008; Weaver et al. 2003). Ce dernier possède d'ailleurs un domaine de liaison au domaine PDZ (Mok et al. 2002) qui lui permettrait de se lier à Dvl3.

D'autres partenaires comme Mast2, cdca8, Npc2, Lats1 et E2F7 n'ont jamais été liés avec la signalisation Wnt. La confirmation d'une interaction directe avec Dvl3 démontrerait de nouvelles interrelations non connues qui existent entre ces voies de signalisation et le système Wnt/Fzd.

Les interactions entre ces gènes candidats et Dvl3 Δ DIX seront vérifiées dans un système d'eucaryote supérieur. La vérification va être réalisée par 2 approches :

- par analyse biochimique dans un système de double hybride adapté dans les cellules eucaryotes
- par immunoprécipitation

Une fois leur interaction confirmée, les partenaires sélectionnés seront étudiés plus en détail dans leur fonction, en la liant à la signalisation Wnt.

CONCLUSION GENERALE

Au cours de ma thèse, j'ai pu montrer que le système Wnt/Fzd, qui est hautement impliqué dans le contrôle de divers processus biologiques et cellulaires, régule de manière importante la formation des vaisseaux sanguins.

Tout d'abord, la signalisation Wnt/Fzd augmente fortement les propriétés angiogéniques des MSC. Ces cellules jouent un rôle structural dans le processus d'angiogenèse, et nous avons mis en évidence que ce rôle est potentialisé par un régulateur de la voie Wnt, sFRP1, qui améliore la maturation et la stabilisation des néo-vaisseaux. De plus, ces cellules sont aussi un outil puissant pour la thérapie cellulaire, car elles augmentent la néo-vascularisation après ischémie. Ce processus est potentialisé par le traitement des MSC en hypoxie qui va jouer un rôle critique sur leurs propriétés. Des études avaient déjà montré le rôle de gradients hypoxiques sur le trafic des MSC dans les tissus ischémiques (Ceradini et al. 2004). Mais dans cette étude, nous mettons en évidence le rôle du ligand Wnt4 dans la potentialisation des propriétés angiogéniques induite par le traitement des MSC par l'hypoxie, et ce, via un mécanisme paracrine.

Ces deux études auxquelles j'ai participé révèlent ainsi la capacité du système Wnt/Fzd à potentialiser les propriétés angiogéniques des MSC lors de la néo-angiogenèse.

Dans la seconde partie, je me suis intéressée au récepteur Fzd4, un des membres du système Wnt/Fzd, et montré qu'il est directement impliqué dans la morphogenèse vasculaire. L'utilisation de souris transgéniques, délétées pour le gène *fzd4*, a mis en évidence un rôle majeur de Fzd4 dans la croissance des ramifications artérielles, notamment au niveau du cœur, des reins et des pattes. Par l'étude des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses primaires isolées à partir de souris *fzd4*^{+/+} et *fzd4*^{-/-}, nous avons pu lier ce phénotype artériel à une dérégulation des propriétés fonctionnelles des cellules vasculaires induite par la délétion du gène *fzd4*. Cette dérégulation a mis en évidence des interrelations qui existent entre la signalisation Fzd4 et les voies du bFGF, du TGF- β et d'E2F1. Ce récepteur est donc impliqué dans la régulation de différents processus cellulaires angiogéniques, même si son mode d'action sur la régulation de ces voies de signalisation n'est pas encore clair. La compréhension des mécanismes moléculaires mis en jeu par Fzd4 a d'ailleurs débuté avec l'étude de la participation de la protéine Dvl3 dans ce système et la recherche de ses partenaires intracellulaires.

En résumé, ces résultats démontrent un rôle central de la signalisation Wnt dans la morphogenèse vasculaire, et placent les éléments de cette voie comme candidats potentiels pour activer la formation de néo-vaisseaux dans un tissu ischémique. Ce rôle central est sans doute dû au fait que la voie Wnt apparaît être au cœur de la régulation de diverses voies de signalisation impliquées dans l'angiogenèse. De nouvelles perspectives de recherche s'ouvrent ainsi sur la voie Wnt/Fzd afin de comprendre les différents mécanismes mis en jeu lors de l'angiogenèse, mais de nombreux points restent encore à éclaircir pour mettre au point des approches thérapeutiques afin d'améliorer au mieux le traitement des pathologies ischémiques.

ANNEXE

E2F1 dans le cycle cellulaire

Suite aux résultats obtenus où l'on a montré que la perte du gène *fzd4* induisait une inhibition du taux d'ARNm E2F1 et de ses gènes cibles dans les cœurs nouveau-nés de souris, une partie annexe décrivant le rôle d'E2F1 dans le cycle cellulaire était nécessaire. De même, les données montrant l'interrelation qui existe entre E2F1 et la signalisation Wnt ont été décrites.

E2F1 appartient à la famille des facteurs de transcription E2F. Cette famille comprend 8 membres différents (E2F1-8) qui, coordonnés, jouent un rôle central dans la prolifération cellulaire. Les membres de la famille E2F1 contrôlent à la fois l'expression de gènes requis pour la progression du cycle cellulaire, particulièrement la synthèse d'ADN, et ceux impliqués dans l'apoptose. Basé sur leurs fonctions, ces 8 membres ont été divisés en 2 sous-groupes : les facteurs de transcriptions activateurs (E2F1 ; 2 ; 3a) et les facteurs de transcriptions répresseurs (E2F3b ; 4 ; 5 ; 6 ; 7 ; 8).

L'activité de E2F est régulée d'une manière cycle cellulaire dépendante, principalement via sa dimérisation avec les membres de la famille DP (DP-1 et DP-2) et son association temporaire avec les petites protéines pRb (retinoblastoma), p107, p130. Bien que les membres de la famille E2F partagent une grande homologie entre eux et que leurs activités soient redondantes, une certaine spécificité de la régulation de l'activité des E2F reste maintenue. Cette spécificité passe par la localisation subcellulaire des E2F et les interactions des E2F avec les différentes petites protéines tout au long du cycle cellulaire. Ensemble, ces facteurs engendrent une signalisation induisant la croissance cellulaire, l'arrêt du cycle cellulaire, et la différenciation terminale.

I. Les rôles opposés de E2F1

Dans l'étude sur l'implication de Fzd4 dans la morphogenèse vasculaire, nous nous sommes intéressés plus particulièrement au facteur de transcription E2F1. Il joue un rôle crucial dans le contrôle de la progression du cycle cellulaire, du fait de sa capacité à être lié et régulé par la protéine suppresseur de tumeur du rétinoblastome (pRb) (Amanullah et al. 2000).

Des études ont montré qu'E2F1 régulait le cycle cellulaire d'une manière positive et négative. Il fonctionne à la fois en tant qu'oncogène (Xu et al. 1995) ou suppresseur de tumeurs (Phillips et al. 1999). La nature de cette dualité est basée sur le degré d'expression d'E2F1, sur le degré des dommages de l'ADN, et sur la transactivation des gènes cibles.

A. Activateur du cycle cellulaire

En condition normale, E2F1 stimule la progression du cycle cellulaire en contrôlant un large spectre de gènes requis dans la synthèse d'ADN et dans la prolifération.

Dans les cellules quiescentes, pRb forme un hétérodimère avec E2F1, réprimant les gènes cibles d'E2F1, et donc exerçant un contrôle négatif sur le cycle cellulaire.

Lorsque la cellule est en division active, des complexes cycline/CDK (cyclin dépendant kinases) viennent phosphoryler pRb, dissociant le complexe pRb/E2F1. Libre, E2F1 se dimérise avec son partenaire DP-1, et joue son rôle d'activateur de la transcription. Il induit la transactivation des gènes cibles d'E2F1 responsables de l'avancement du cycle cellulaire en phase S. Les gènes cibles d'E2F1 codent pour des protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire telles que la cycline E, cdc6, la thymidylate synthetase (TS), la ribonucleotide reductase (RR) et p107 (**Figure 79**).

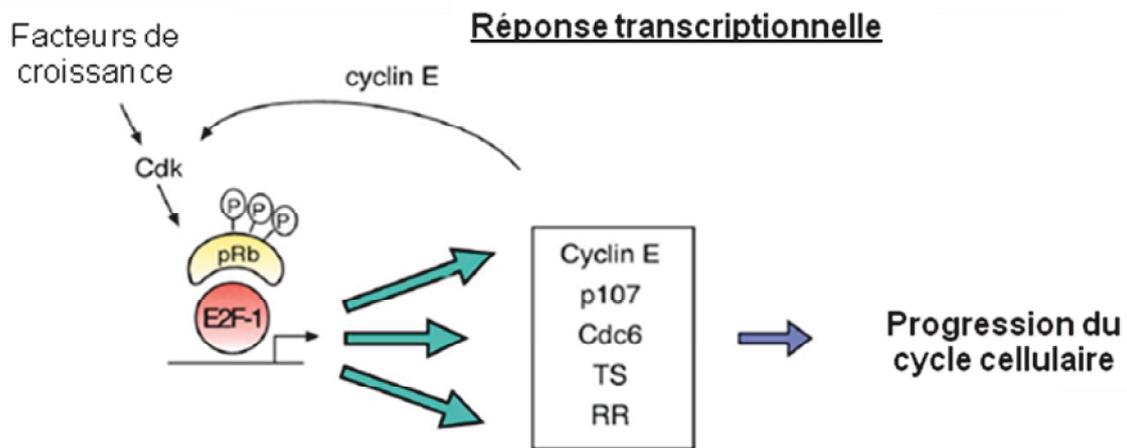


Figure 79: E2F1 dans la progression du cycle cellulaire
D'après (Stevens et al. 2004)

Lors de cette réponse, E2F1 montre des propriétés oncogéniques *in vitro* et *in vivo* (Johnson et al. 1993; Yamasaki et al. 1998). Par exemple, les cellules déficientes en E2F1 manifestent des défauts dans la progression du cycle cellulaire à des stades précoces (DeGregori et al. 1997; Wu et al. 2001).

B. Répresseur du cycle cellulaire

E2F1 peut aussi jouer un rôle dans l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose (Trimarchi et al. 2002). Lorsque l'ADN est endommagé, E2F1 est phosphorylé par des kinases (ATM/ATR et Chk2), améliorant sa stabilisation. Il s'ensuit un niveau élevé de E2F1 ou des modifications de la protéine, ce qui permet l'activation de plusieurs gènes impliqués dans l'apoptose

(apoptosis protease-activating factor 1 (Apaf-1), alternative reading frame (ARF), Chk1 et ATM) (**Figure 80**).

Différentes études ont montré que la surexpression de E2F1 pouvait amener les cellules en apoptose dans des lignées cellulaires, via un mécanisme p53 dépendant (Hsieh et al. 2002; Kowalik et al. 1995) et indépendant (Nahle et al. 2002). Ceci a aussi été démontré en utilisant un modèle de souris transgéniques (Pierce et al. 1998).

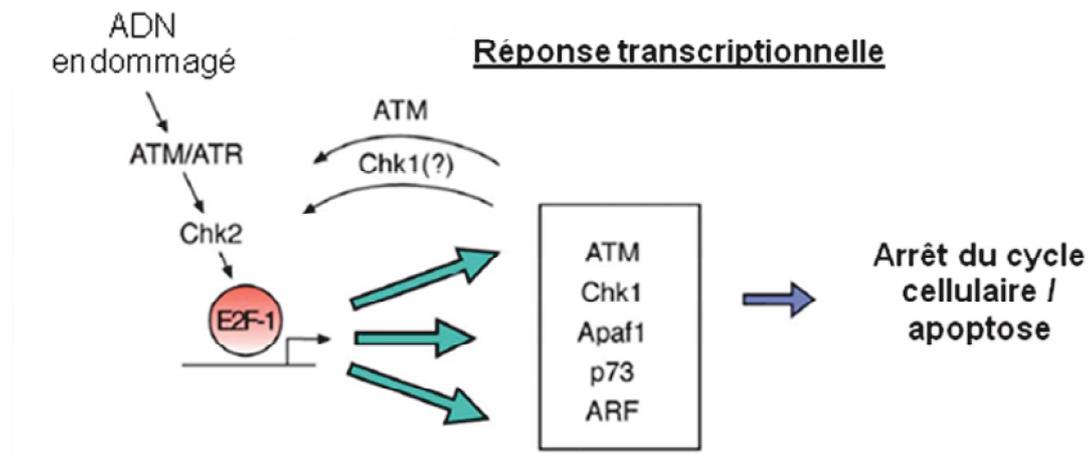


Figure 80 : E2F1 dans la progression du cycle cellulaire
D'après (Stevens et al. 2004)

II. E2F1 et le système Wnt/ β -caténine

Les systèmes pRb/E2F et Wnt/ β -caténine sont deux voies de signalisations les plus fréquemment dérégulées dans les cancers humains. Depuis 2004, quelques études ont fait le lien entre ces deux voies.

En 2005, Hughes et al. ont montré que E2F1 pouvait induire l'expression de l'axine2, un des membres du complexe de dégradation de la β -caténine dans la voie Wnt canonique. E2F1 induisait l'inhibition de cette voie, et donc l'inhibition de la croissance cellulaire via le facteur de transcription TCF (Hughes et al. 2005; Hughes et al. 2005). Il montrait ici une interrelation entre ces deux voies impliquée dans la suppression de formation de la tumeur.

E2F1 inhibe aussi la transcription dépendante de la β -caténine/TCF. Cette induction de l'apoptose se traduit par une altération de l'expression des gènes cibles de la β -caténine (c-myc) et une induction de la dégradation de la β -caténine indépendamment du système de dégradation APC/GSK3 β (Morris et al. 2008).

Enfin, le facteur de transcription LEF1 a aussi été relié au système E2F1. LEF1 peut s'associer avec E2F1 et activer la transcription de E2F1 et de ses gènes cibles, et ce, indépendamment de la β -caténine (Zhou et al. 2008). De plus, différentes études ont montré l'implication de LEF1 et E2F1 dans la prolifération cellulaire et l'apoptose, suggérant ainsi que LEF1 participerait à la régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose via E2F1.

BIBLIOGRAPHIE

- Aase, K., Ernkvist, M., et al. (2007). "Angiomotin regulates endothelial cell migration during embryonic angiogenesis." Genes Dev **21**(16): 2055-68.
- Abedin, M., Tintut, Y., et al. (2004). "Mesenchymal stem cells and the artery wall." Circ Res **95**(7): 671-6.
- Aberle, H., Bauer, A., et al. (1997). "beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway." Embo J **16**(13): 3797-804.
- Abramsson, A., Lindblom, P., et al. (2003). "Endothelial and nonendothelial sources of PDGF-B regulate pericyte recruitment and influence vascular pattern formation in tumors." J Clin Invest **112**(8): 1142-51.
- Adler, P. N. (2002). "Planar signaling and morphogenesis in Drosophila." Dev Cell **2**(5): 525-35.
- Adler, P. N., Krasnow, R. E., et al. (1997). "Tissue polarity points from cells that have higher Frizzled levels towards cells that have lower Frizzled levels." Curr Biol **7**(12): 940-9.
- Akhurst, R. J., Lehnert, S. A., et al. (1990). "TGF beta in murine morphogenetic processes: the early embryo and cardiogenesis." Development **108**(4): 645-56.
- Al-Khalidi, A., Al-Sabti, H., et al. (2003). "Therapeutic angiogenesis using autologous bone marrow stromal cells: improved blood flow in a chronic limb ischemia model." Ann Thorac Surg **75**(1): 204-9.
- Alexander, D. L., Ganem, L. G., et al. (1998). "Aryl-hydrocarbon receptor is an inhibitory regulator of lipid synthesis and of commitment to adipogenesis." J Cell Sci **111** (Pt **22**): 3311-22.
- Amado, L. C., Saliaris, A. P., et al. (2005). "Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(32): 11474-9.
- Amanullah, A., Hoffman, B., et al. (2000). "Deregulated E2F-1 blocks terminal differentiation and loss of leukemogenicity of M1 myeloblastic leukemia cells without abrogating induction of p15(INK4B) and p16(INK4A)." Blood **96**(2): 475-82.
- Andersson, G., Denaro, M., et al. (2003). "Engraftment of retroviral EGFP-transduced bone marrow in mice prevents rejection of EGFP-transgenic skin grafts." Mol Ther **8**(3): 385-91.
- Arnaud, E., Touriol, C., et al. (1999). "A new 34-kilodalton isoform of human fibroblast growth factor 2 is cap dependently synthesized by using a non-AUG start codon and behaves as a survival factor." Mol Cell Biol **19**(1): 505-14.
- Arras, M., Ito, W. D., et al. (1998). "Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb." J Clin Invest **101**(1): 40-50.
- Asahara, T., Takahashi, T., et al. (1999). "VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells." Embo J **18**(14): 3964-72.
- Au, P., Tam, J., et al. (2008). "Bone marrow-derived mesenchymal stem cells facilitate engineering of long-lasting functional vasculature." Blood **111**(9): 4551-8.
- Axelrod, J. D., Matsuno, K., et al. (1996). "Interaction between Wingless and Notch signaling pathways mediated by Dishevelled." Science **271**(5257): 1826-32.
- Axelrod, J. D., Miller, J. R., et al. (1998). "Differential recruitment of Dishevelled provides signaling specificity in the planar cell polarity and Wingless signaling pathways." Genes Dev **12**(16): 2610-22.
- Bader, B. L., Rayburn, H., et al. (1998). "Extensive vasculogenesis, angiogenesis, and organogenesis precede lethality in mice lacking all alpha v integrins." Cell **95**(4): 507-19.

- Bafico, A., Gazit, A., et al. (1999). "Interaction of frizzled related protein (FRP) with Wnt ligands and the frizzled receptor suggests alternative mechanisms for FRP inhibition of Wnt signaling." *J Biol Chem* **274**(23): 16180-7.
- Bafico, A., Liu, G., et al. (2001). "Novel mechanism of Wnt signalling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/Arrow." *Nat Cell Biol* **3**(7): 683-6.
- Baldessari, D. et Mione, M. (2008). "How to create the vascular tree? (Latest) help from the zebrafish." *Pharmacol Ther* **118**(2): 206-30.
- Barandon, L., Couffinhal, T., et al. (2003). "Reduction of infarct size and prevention of cardiac rupture in transgenic mice overexpressing FrzA." *Circulation* **108**(18): 2282-9.
- Barker, N., Hurlstone, A., et al. (2001). "The chromatin remodelling factor Brg-1 interacts with beta-catenin to promote target gene activation." *Embo J* **20**(17): 4935-43.
- Bartram, U., Molin, D. G., et al. (2001). "Double-outlet right ventricle and overriding tricuspid valve reflect disturbances of looping, myocardialization, endocardial cushion differentiation, and apoptosis in TGF-beta(2)-knockout mice." *Circulation* **103**(22): 2745-52.
- Bastock, R., Strutt, H., et al. (2003). "Strabismus is asymmetrically localised and binds to Prickle and Dishevelled during Drosophila planar polarity patterning." *Development* **130**(13): 3007-14.
- Bayless, K. J., Salazar, R., et al. (2000). "RGD-dependent vacuolation and lumen formation observed during endothelial cell morphogenesis in three-dimensional fibrin matrices involves the alpha(v)beta(3) and alpha(5)beta(1) integrins." *Am J Pathol* **156**(5): 1673-83.
- Bazzoni, G. et Dejana, E. (2004). "Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis." *Physiol Rev* **84**(3): 869-901.
- Beenken, A. et Mohammadi, M. (2009). "The FGF family: biology, pathophysiology and therapy." *Nat Rev Drug Discov* **8**(3): 235-53.
- Belperio, J. A., Keane, M. P., et al. (2000). "CXC chemokines in angiogenesis." *J Leukoc Biol* **68**(1): 1-8.
- Betsholtz, C., Lindblom, P., et al. (2005). "Role of pericytes in vascular morphogenesis." *Exs*(94): 115-25.
- Bevan, J. A. et Laher, I. (1991). "Pressure and flow-dependent vascular tone." *Faseb J* **5**(9): 2267-73.
- Bhanot, P., Brink, M., et al. (1996). "A new member of the frizzled family from Drosophila functions as a Wingless receptor." *Nature* **382**(6588): 225-30.
- Bijur, G. N. et Jope, R. S. (2001). "Proapoptotic stimuli induce nuclear accumulation of glycogen synthase kinase-3 beta." *J Biol Chem* **276**(40): 37436-42.
- Bikfalvi, A., Klein, S., et al. (1997). "Biological roles of fibroblast growth factor-2." *Endocr Rev* **18**(1): 26-45.
- Bikkavilli, R. K., Feigin, M. E., et al. (2008). "G alpha o mediates WNT-JNK signaling through dishevelled 1 and 3, RhoA family members, and MEKK 1 and 4 in mammalian cells." *J Cell Sci* **121**(Pt 2): 234-45.
- Binnerts, M. E., Kim, K. A., et al. (2007). "R-Spondin1 regulates Wnt signaling by inhibiting internalization of LRP6." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(37): 14700-5.
- Blair, S. S. (1996). "Notch and Wingless signals collide." *Science* **271**(5257): 1822-3.
- Blankesteijn, W. M., van Gijn, M. E., et al. (2000). "Beta-catenin, an inducer of uncontrolled cell proliferation and migration in malignancies, is localized in the cytoplasm of vascular endothelium during neovascularization after myocardial infarction." *Am J Pathol* **157**(3): 877-83.
- Bobik, A. (2006). "Transforming growth factor-betas and vascular disorders." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**(8): 1712-20.

- Bockaert, J. et Pin, J. P. (1999). "Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success." *Embo J* **18**(7): 1723-9.
- Boutros, M., Mihaly, J., et al. (2000). "Signaling specificity by Frizzled receptors in *Drosophila*." *Science* **288**(5472): 1825-8.
- Boutros, M. et Mlodzik, M. (1999). "Dishevelled: at the crossroads of divergent intracellular signaling pathways." *Mech Dev* **83**(1-2): 27-37.
- Boutros, M., Paricio, N., et al. (1998). "Dishevelled activates JNK and discriminates between JNK pathways in planar polarity and wingless signaling." *Cell* **94**(1): 109-18.
- Bovolenta, P., Esteve, P., et al. (2008). "Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease." *J Cell Sci* **121**(Pt 6): 737-46.
- Brantjes, H., Roose, J., et al. (2001). "All Tcf HMG box transcription factors interact with Groucho-related co-repressors." *Nucleic Acids Res* **29**(7): 1410-9.
- Breitbach, M., Bostani, T., et al. (2007). "Potential risks of bone marrow cell transplantation into infarcted hearts." *Blood* **110**(4): 1362-9.
- Bryja, V., Cajanek, L., et al. (2007). "Inhibition of endocytosis blocks Wnt signalling to beta-catenin by promoting dishevelled degradation." *Acta Physiol (Oxf)* **190**(1): 55-61.
- Cadigan, K. M. et Liu, Y. I. (2006). "Wnt signaling: complexity at the surface." *J Cell Sci* **119**(Pt 3): 395-402.
- Cadigan, K. M. et Nusse, R. (1997). "Wnt signaling: a common theme in animal development." *Genes Dev* **11**(24): 3286-305.
- Capelluto, D. G., Kutateladze, T. G., et al. (2002). "The DIX domain targets dishevelled to actin stress fibres and vesicular membranes." *Nature* **419**(6908): 726-9.
- Carmeliet, P. (2000). "Fibroblast growth factor-1 stimulates branching and survival of myocardial arteries: a goal for therapeutic angiogenesis?" *Circ Res* **87**(3): 176-8.
- Carmeliet, P. (2000). "Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis." *Nat Med* **6**(4): 389-95.
- Carron, C., Pascal, A., et al. (2003). "Frizzled receptor dimerization is sufficient to activate the Wnt/beta-catenin pathway." *J Cell Sci* **116**(Pt 12): 2541-50.
- Castoldi, G., Redaelli, S., et al. (2005). "Angiotensin II modulates frizzled-2 receptor expression in rat vascular smooth muscle cells." *Clin Sci (Lond)* **108**(6): 523-30.
- Cattelino, A., Liebner, S., et al. (2003). "The conditional inactivation of the beta-catenin gene in endothelial cells causes a defective vascular pattern and increased vascular fragility." *J Cell Biol* **162**(6): 1111-22.
- Ceradini, D. J., Kulkarni, A. R., et al. (2004). "Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1." *Nat Med* **10**(8): 858-64.
- Chang, J., Sonoyama, W., et al. (2007). "Noncanonical Wnt-4 signaling enhances bone regeneration of mesenchymal stem cells in craniofacial defects through activation of p38 MAPK." *J Biol Chem* **282**(42): 30938-48.
- Chen, C. M., Strapps, W., et al. (2004). "Evidence that the cysteine-rich domain of *Drosophila* Frizzled family receptors is dispensable for transducing Wingless." *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Chen, E., Stringer, S. E., et al. (2005). "A unique role for 6-O sulfation modification in zebrafish vascular development." *Dev Biol* **284**(2): 364-76.
- Chen, L., Wu, Q., et al. (2004). "Expression of Dishevelled-1 in wound healing after acute myocardial infarction: possible involvement in myofibroblast proliferation and migration." *J Cell Mol Med* **8**(2): 257-64.
- Chen, W., ten Berge, D., et al. (2003). "Dishevelled 2 recruits beta-arrestin 2 to mediate Wnt5A-stimulated endocytosis of Frizzled 4." *Science* **301**(5638): 1391-4.

- Cheng, C. W., Smith, S. K., et al. (2003). "Wnt-1 signaling inhibits human umbilical vein endothelial cell proliferation and alters cell morphology." *Exp Cell Res* **291**(2): 415-25.
- Cheng, N., Brantley, D. M., et al. (2002). "The ephrins and Eph receptors in angiogenesis." *Cytokine Growth Factor Rev* **13**(1): 75-85.
- Cheyette, B. N., Waxman, J. S., et al. (2002). "Dapper, a Dishevelled-associated antagonist of beta-catenin and JNK signaling, is required for notochord formation." *Dev Cell* **2**(4): 449-61.
- Chiellini, C., Grenningloh, G., et al. (2008). "Stathmin-like 2, a developmentally-associated neuronal marker, is expressed and modulated during osteogenesis of human mesenchymal stem cells." *Biochem Biophys Res Commun* **374**(1): 64-8.
- Chittenden, T. W., Claes, F., et al. (2006). "Selective regulation of arterial branching morphogenesis by synectin." *Dev Cell* **10**(6): 783-95.
- Chong, J. M., Uren, A., et al. (2002). "Disulfide bond assignments of secreted Frizzled-related protein-1 provide insights about Frizzled homology and netrin modules." *J Biol Chem* **277**(7): 5134-44.
- Chow, D. C., Wenning, L. A., et al. (2001). "Modeling pO(2) distributions in the bone marrow hematopoietic compartment. II. Modified Kroghian models." *Biophys J* **81**(2): 685-96.
- Ciani, L., Krylova, O., et al. (2004). "A divergent canonical WNT-signaling pathway regulates microtubule dynamics: dishevelled signals locally to stabilize microtubules." *J Cell Biol* **164**(2): 243-53.
- Cirone, P., Lin, S., et al. (2008). "A role for planar cell polarity signaling in angiogenesis." *Angiogenesis* **11**(4): 347-60.
- Ciruna, B. et Rossant, J. (2001). "FGF signaling regulates mesoderm cell fate specification and morphogenetic movement at the primitive streak." *Dev Cell* **1**(1): 37-49.
- Cleaver, O. et Melton, D. A. (2003). "Endothelial signaling during development." *Nat Med* **9**(6): 661-8.
- Cliffe, A., Hamada, F., et al. (2003). "A role of Dishevelled in relocating Axin to the plasma membrane during wingless signaling." *Curr Biol* **13**(11): 960-6.
- Colvin, J. S., Bohne, B. A., et al. (1996). "Skeletal overgrowth and deafness in mice lacking fibroblast growth factor receptor 3." *Nat Genet* **12**(4): 390-7.
- Corbit, K. C., Shyer, A. E., et al. (2008). "Kif3a constrains beta-catenin-dependent Wnt signalling through dual ciliary and non-ciliary mechanisms." *Nat Cell Biol* **10**(1): 70-6.
- Couper, L. L., Bryant, S. R., et al. (1997). "Vascular endothelial growth factor increases the mitogenic response to fibroblast growth factor-2 in vascular smooth muscle cells in vivo via expression of fms-like tyrosine kinase-1." *Circ Res* **81**(6): 932-9.
- Crease, D. J., Dyson, S., et al. (1998). "Cooperation between the activin and Wnt pathways in the spatial control of organizer gene expression." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(8): 4398-403.
- Dailey, L., Ambrosetti, D., et al. (2005). "Mechanisms underlying differential responses to FGF signaling." *Cytokine Growth Factor Rev* **16**(2): 233-47.
- Daneman, R., Agalliu, D., et al. (2009). "Wnt/beta-catenin signaling is required for CNS, but not non-CNS, angiogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(2): 641-6.
- Dann, C. E., Hsieh, J. C., et al. (2001). "Insights into Wnt binding and signalling from the structures of two Frizzled cysteine-rich domains." *Nature* **412**(6842): 86-90.
- Das, G., Jenny, A., et al. (2004). "Diego interacts with Prickle and Strabismus/Van Gogh to localize planar cell polarity complexes." *Development* **131**(18): 4467-76.

- Davidson, G., Wu, W., et al. (2005). "Casein kinase 1 gamma couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction." *Nature* **438**(7069): 867-72.
- Davis, G. E., Bayless, K. J., et al. (2002). "Molecular basis of endothelial cell morphogenesis in three-dimensional extracellular matrices." *Anat Rec* **268**(3): 252-75.
- De Boer, J., Wang, H. J., et al. (2004). "Effects of Wnt signaling on proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells." *Tissue Eng* **10**(3-4): 393-401.
- de Jesus Perez, V. A., Alastalo, T. P., et al. (2009). "Bone morphogenetic protein 2 induces pulmonary angiogenesis via Wnt-beta-catenin and Wnt-RhoA-Rac1 pathways." *J Cell Biol* **184**(1): 83-99.
- De Martin, R., Hoeth, M., et al. (2000). "The transcription factor NF-kappa B and the regulation of vascular cell function." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**(11): E83-8.
- De Palma, M., Venneri, M. A., et al. (2005). "Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors." *Cancer Cell* **8**(3): 211-26.
- De Smet, F., Segura, I., et al. (2009). "Mechanisms of vessel branching: filopodia on endothelial tip cells lead the way." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **29**(5): 639-49.
- Deb, A., Davis, B. H., et al. (2008). "SFRP2 regulates cardiomyogenic differentiation by inhibiting a positive transcriptional autofeedback loop of Wnt3a." *Stem Cells* **26**(1): 35-44.
- Deckers, M. M., van Bezooijen, R. L., et al. (2002). "Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A." *Endocrinology* **143**(4): 1545-53.
- DeGregori, J., Leone, G., et al. (1997). "Distinct roles for E2F proteins in cell growth control and apoptosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(14): 7245-50.
- Dejana, E. (2004). "Endothelial cell-cell junctions: happy together." *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(4): 261-70.
- dela Paz, N. G. et D'Amore, P. A. (2009). "Arterial versus venous endothelial cells." *Cell Tissue Res* **335**(1): 5-16.
- Deng, C., Wynshaw-Boris, A., et al. (1996). "Fibroblast growth factor receptor 3 is a negative regulator of bone growth." *Cell* **84**(6): 911-21.
- Deng, C. X., Wynshaw-Boris, A., et al. (1994). "Murine FGFR-1 is required for early postimplantation growth and axial organization." *Genes Dev* **8**(24): 3045-57.
- Dennis, S., Aikawa, M., et al. (1999). "A secreted frizzled related protein, FrzA, selectively associates with Wnt-1 protein and regulates wnt-1 signaling." *J Cell Sci* **112** (Pt 21): 3815-20.
- Derfoul, A., Carlberg, A. L., et al. (2004). "Differential regulation of osteogenic marker gene expression by Wnt-3a in embryonic mesenchymal multipotential progenitor cells." *Differentiation* **72**(5): 209-23.
- Derynck, R. et Zhang, Y. E. (2003). "Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling." *Nature* **425**(6958): 577-84.
- Desplat, V., Faucher, J. L., et al. (2002). "Hypoxia modifies proliferation and differentiation of CD34(+) CML cells." *Stem Cells* **20**(4): 347-54.
- Dickson, M. C., Martin, J. S., et al. (1995). "Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor-beta 1 knock out mice." *Development* **121**(6): 1845-54.
- Djiane, A., Riou, J., et al. (2000). "Role of frizzled 7 in the regulation of convergent extension movements during gastrulation in *Xenopus laevis*." *Development* **127**(14): 3091-100.
- Doble, B. W. et Woodgett, J. R. (2003). "GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase." *J Cell Sci* **116**(Pt 7): 1175-86.
- Dono, R., Texido, G., et al. (1998). "Impaired cerebral cortex development and blood pressure regulation in FGF-2-deficient mice." *Embo J* **17**(15): 4213-25.

- Du, R., Lu, K. V., et al. (2008). "HIF1alpha induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion." Cancer Cell **13**(3): 206-20.
- Du, S. J., Purcell, S. M., et al. (1995). "Identification of distinct classes and functional domains of Wnts through expression of wild-type and chimeric proteins in *Xenopus* embryos." Mol Cell Biol **15**(5): 2625-34.
- Dubois, T., Kerai, P., et al. (2001). "Casein kinase I associates with members of the centaurin-alpha family of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-binding proteins." J Biol Chem **276**(22): 18757-64.
- Dufourcq, P., Couffignal, T., et al. (2002). "FrzA, a secreted frizzled related protein, induced angiogenic response." Circulation **106**(24): 3097-103.
- Dufourcq, P., Descamps, B., et al. (2008). "Secreted frizzled-related protein-1 enhances mesenchymal stem cell function in angiogenesis and contributes to neovessel maturation." Stem Cells **26**(11): 2991-3001.
- Dufourcq, P., Leroux, L., et al. (2008). "Regulation of endothelial cell cytoskeletal reorganization by a secreted frizzled-related protein-1 and frizzled 4- and frizzled 7-dependent pathway: role in neovessel formation." Am J Pathol **172**(1): 37-49.
- Duplaa, C., Jaspard, B., et al. (1999). "Identification and cloning of a secreted protein related to the cysteine-rich domain of frizzled. Evidence for a role in endothelial cell growth control." Circ Res **84**(12): 1433-45.
- Easwaran, V., Lee, S. H., et al. (2003). "beta-Catenin regulates vascular endothelial growth factor expression in colon cancer." Cancer Res **63**(12): 3145-53.
- Eberhart, C. G., Brat, D. J., et al. (2000). "Pediatric neuroblastic brain tumors containing abundant neuropil and true rosettes." Pediatr Dev Pathol **3**(4): 346-52.
- Eberhart, C. G., Tihan, T., et al. (2000). "Nuclear localization and mutation of beta-catenin in medulloblastomas." J Neuropathol Exp Neurol **59**(4): 333-7.
- Eisenberg, L. M. et Eisenberg, C. A. (2006). "Wnt signal transduction and the formation of the myocardium." Dev Biol **293**(2): 305-15.
- Eliceiri, B. P. et Cheresch, D. A. (1999). "The role of alphav integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development." J Clin Invest **103**(9): 1227-30.
- Eliceiri, B. P. et Cheresch, D. A. (2001). "Adhesion events in angiogenesis." Curr Opin Cell Biol **13**(5): 563-8.
- Eliceiri, B. P., Paul, R., et al. (1999). "Selective requirement for Src kinases during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability." Mol Cell **4**(6): 915-24.
- Endo, Y., Beauchamp, E., et al. (2008). "Wnt-3a and Dickkopf-1 stimulate neurite outgrowth in Ewing tumor cells via a Frizzled3- and c-Jun N-terminal kinase-dependent mechanism." Mol Cell Biol **28**(7): 2368-79.
- Esch, F., Baird, A., et al. (1985). "Primary structure of bovine pituitary basic fibroblast growth factor (FGF) and comparison with the amino-terminal sequence of bovine brain acidic FGF." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(19): 6507-11.
- Esufali, S., Charames, G. S., et al. (2007). "Activation of tumor-specific splice variant Rac1b by dishevelled promotes canonical Wnt signaling and decreased adhesion of colorectal cancer cells." Cancer Res **67**(6): 2469-79.
- Etheridge, S. L., Ray, S., et al. (2008). "Murine dishevelled 3 functions in redundant pathways with dishevelled 1 and 2 in normal cardiac outflow tract, cochlea, and neural tube development." PLoS Genet **4**(11): e1000259.
- Etheridge, S. L., Spencer, G. J., et al. (2004). "Expression profiling and functional analysis of wnt signaling mechanisms in mesenchymal stem cells." Stem Cells **22**(5): 849-60.

- Ezan, J., Leroux, L., et al. (2004). "FrzA/sFRP-1, a secreted antagonist of the Wnt-Frizzled pathway, controls vascular cell proliferation in vitro and in vivo." Cardiovasc Res **63**(4): 731-8.
- Fahnert, B., Veijola, J., et al. (2004). "Murine Wnt-1 with an internal c-myc tag recombinantly produced in Escherichia coli can induce intracellular signaling of the canonical Wnt pathway in eukaryotic cells." J Biol Chem **279**(46): 47520-7.
- Fanto, M. et McNeill, H. (2004). "Planar polarity from flies to vertebrates." J Cell Sci **117**(Pt 4): 527-33.
- Fearnhead, N. S., Britton, M. P., et al. (2001). "The ABC of APC." Hum Mol Genet **10**(7): 721-33.
- Ferrara, N., Gerber, H. P., et al. (2003). "The biology of VEGF and its receptors." Nat Med **9**(6): 669-76.
- Finch, P. W., He, X., et al. (1997). "Purification and molecular cloning of a secreted, Frizzled-related antagonist of Wnt action." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(13): 6770-5.
- Flamme, I., Schulze-Osthoff, K., et al. (1991). "Mitogenic activity of chicken chorioallantoic fluid is temporally correlated to vascular growth in the chorioallantoic membrane and related to fibroblast growth factors." Development **111**(3): 683-90.
- Florkiewicz, R. Z. et Sommer, A. (1989). "Human basic fibroblast growth factor gene encodes four polypeptides: three initiate translation from non-AUG codons." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(11): 3978-81.
- Fodde, R. (2002). "The APC gene in colorectal cancer." Eur J Cancer **38**(7): 867-71.
- Folkman, J. (1995). "Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis." N Engl J Med **333**(26): 1757-63.
- Folkman, J. et Klagsbrun, M. (1987). "Angiogenic factors." Science **235**(4787): 442-7.
- Foord, S. M., Jupe, S., et al. (2002). "Bioinformatics and type II G-protein-coupled receptors." Biochem Soc Trans **30**(4): 473-9.
- Fox, J. M., Chamberlain, G., et al. (2007). "Recent advances into the understanding of mesenchymal stem cell trafficking." Br J Haematol **137**(6): 491-502.
- Fredriksson, R., Lagerstrom, M. C., et al. (2003). "The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints." Mol Pharmacol **63**(6): 1256-72.
- Funayama, N., Fagotto, F., et al. (1995). "Embryonic axis induction by the armadillo repeat domain of beta-catenin: evidence for intracellular signaling." J Cell Biol **128**(5): 959-68.
- Gaengel, K., Genove, G., et al. (2009). "Endothelial-mural cell signaling in vascular development and angiogenesis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **29**(5): 630-8.
- Gale, N. W. et Yancopoulos, G. D. (1999). "Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development." Genes Dev **13**(9): 1055-66.
- Galmiche, M. C., Kotliansky, V. E., et al. (1993). "Stromal cells from human long-term marrow cultures are mesenchymal cells that differentiate following a vascular smooth muscle differentiation pathway." Blood **82**(1): 66-76.
- Galzie, Z., Kinsella, A. R., et al. (1997). "Fibroblast growth factors and their receptors." Biochem Cell Biol **75**(6): 669-85.
- Gamble, J. R., Drew, J., et al. (2000). "Angiopoietin-1 is an antipermeability and anti-inflammatory agent in vitro and targets cell junctions." Circ Res **87**(7): 603-7.
- Gao, Y., Li, M., et al. (2000). "Synectin, syndecan-4 cytoplasmic domain binding PDZ protein, inhibits cell migration." J Cell Physiol **184**(3): 373-9.
- Gassmann, R., Carvalho, A., et al. (2004). "Borealin: a novel chromosomal passenger required for stability of the bipolar mitotic spindle." J Cell Biol **166**(2): 179-91.

- Gendron, R. L., Adams, L. C., et al. (2000). "Tubedown-1, a novel acetyltransferase associated with blood vessel development." *Dev Dyn* **218**(2): 300-15.
- Geretti, E., Shimizu, A., et al. (2008). "Neuropilin structure governs VEGF and semaphorin binding and regulates angiogenesis." *Angiogenesis* **11**(1): 31-9.
- Gerhardt, H., Golding, M., et al. (2003). "VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia." *J Cell Biol* **161**(6): 1163-77.
- Ghabrial, A. S. et Krasnow, M. A. (2006). "Social interactions among epithelial cells during tracheal branching morphogenesis." *Nature* **441**(7094): 746-9.
- Giese, K., Cox, J., et al. (1992). "The HMG domain of lymphoid enhancer factor 1 bends DNA and facilitates assembly of functional nucleoprotein structures." *Cell* **69**(1): 185-95.
- Giles, R. H., van Es, J. H., et al. (2003). "Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer." *Biochim Biophys Acta* **1653**(1): 1-24.
- Gloy, J., Hikasa, H., et al. (2002). "Frodo interacts with Dishevelled to transduce Wnt signals." *Nat Cell Biol* **4**(5): 351-7.
- Goodwin, A. M. et D'Amore, P. A. (2002). "Wnt signaling in the vasculature." *Angiogenesis* **5**(1-2): 1-9.
- Gordon, M. D. et Nusse, R. (2006). "Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors." *J Biol Chem* **281**(32): 22429-33.
- Goumans, M. J., Lebrin, F., et al. (2003). "Controlling the angiogenic switch: a balance between two distinct TGF- β receptor signaling pathways." *Trends Cardiovasc Med* **13**(7): 301-7.
- Goumans, M. J., Valdimarsdottir, G., et al. (2002). "Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF- β type I receptors." *Embo J* **21**(7): 1743-53.
- Gradl, D., Kuhl, M., et al. (1999). "Keeping a close eye on Wnt-1/wg signaling in Xenopus." *Mech Dev* **86**(1-2): 3-15.
- Grandy, D., Shan, J., et al. (2009). "Discovery and characterization of a small molecule inhibitor of the PDZ domain of dishevelled." *J Biol Chem* **284**(24): 16256-63.
- Grazia Lampugnani, M., Zanetti, A., et al. (2003). "Contact inhibition of VEGF-induced proliferation requires vascular endothelial cadherin, beta-catenin, and the phosphatase DEP-1/CD148." *J Cell Biol* **161**(4): 793-804.
- Guo, D., Jia, Q., et al. (1995). "Vascular endothelial cell growth factor promotes tyrosine phosphorylation of mediators of signal transduction that contain SH2 domains. Association with endothelial cell proliferation." *J Biol Chem* **270**(12): 6729-33.
- Guo, D. Q., Wu, L. W., et al. (2000). "Tumor necrosis factor employs a protein-tyrosine phosphatase to inhibit activation of KDR and vascular endothelial cell growth factor-induced endothelial cell proliferation." *J Biol Chem* **275**(15): 11216-21.
- Guo, N., Hawkins, C., et al. (2004). "Frizzled6 controls hair patterning in mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(25): 9277-81.
- Guo, X. et Wang, X. F. (2009). "Signaling cross-talk between TGF- β /BMP and other pathways." *Cell Res* **19**(1): 71-88.
- Habas, R., Dawid, I. B., et al. (2003). "Coactivation of Rac and Rho by Wnt/Frizzled signaling is required for vertebrate gastrulation." *Genes Dev* **17**(2): 295-309.
- Habas, R., Kato, Y., et al. (2001). "Wnt/Frizzled activation of Rho regulates vertebrate gastrulation and requires a novel Formin homology protein Daam1." *Cell* **107**(7): 843-54.
- Hamada, F., Tomoyasu, Y., et al. (1999). "Negative regulation of Wingless signaling by D-axin, a Drosophila homolog of axin." *Science* **283**(5408): 1739-42.

- Hamblet, N. S., Lijam, N., et al. (2002). "Dishevelled 2 is essential for cardiac outflow tract development, somite segmentation and neural tube closure." Development **129**(24): 5827-38.
- Han, G., Li, A. G., et al. (2006). "Smad7-induced beta-catenin degradation alters epidermal appendage development." Dev Cell **11**(3): 301-12.
- Hayashi, K., Erikson, D. W., et al. (2009). "Wnt genes in the mouse uterus: potential regulation of implantation." Biol Reprod **80**(5): 989-1000.
- Hayashi, T., Mizuno, N., et al. (2004). "FGF2 triggers iris-derived lens regeneration in newt eye." Mech Dev **121**(6): 519-26.
- He, T. C., Sparks, A. B., et al. (1998). "Identification of c-MYC as a target of the APC pathway." Science **281**(5382): 1509-12.
- He, X., Saint-Jeannet, J. P., et al. (1997). "A member of the Frizzled protein family mediating axis induction by Wnt-5A." Science **275**(5306): 1652-4.
- He, X., Semenov, M., et al. (2004). "LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way." Development **131**(8): 1663-77.
- Heil, M. et Schaper, W. (2004). "Influence of mechanical, cellular, and molecular factors on collateral artery growth (arteriogenesis)." Circ Res **95**(5): 449-58.
- Heldin, C. H. et Westermark, B. (1999). "Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor." Physiol Rev **79**(4): 1283-316.
- Hellstrom, M., Phng, L. K., et al. (2007). "Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis." Nature **445**(7129): 776-80.
- Herrera, R. et Sebolt-Leopold, J. S. (2002). "Unraveling the complexities of the Raf/MAP kinase pathway for pharmacological intervention." Trends Mol Med **8**(4 Suppl): S27-31.
- Hiraki, Y. et Shukunami, C. (2000). "Chondromodulin-I as a novel cartilage-specific growth-modulating factor." Pediatr Nephrol **14**(7): 602-5.
- Hirschi, K. K., Burt, J. M., et al. (2003). "Gap junction communication mediates transforming growth factor-beta activation and endothelial-induced mural cell differentiation." Circ Res **93**(5): 429-37.
- Hirschi, K. K., Rohovsky, S. A., et al. (1999). "Endothelial cells modulate the proliferation of mural cell precursors via platelet-derived growth factor-BB and heterotypic cell contact." Circ Res **84**(3): 298-305.
- Hocevar, B. A., Mou, F., et al. (2003). "Regulation of the Wnt signaling pathway by disabled-2 (Dab2)." Embo J **22**(12): 3084-94.
- Hoch, R. V. et Soriano, P. (2003). "Roles of PDGF in animal development." Development **130**(20): 4769-84.
- Holmen, S. L., Robertson, S. A., et al. (2005). "Wnt-independent activation of beta-catenin mediated by a Dkk1-Fz5 fusion protein." Biochem Biophys Res Commun **328**(2): 533-9.
- Holnthoner, W., Pillinger, M., et al. (2002). "Fibroblast growth factor-2 induces Lef/Tcf-dependent transcription in human endothelial cells." J Biol Chem **277**(48): 45847-53.
- Hoppler, S. et Moon, R. T. (1998). "BMP-2/-4 and Wnt-8 cooperatively pattern the Xenopus mesoderm." Mech Dev **71**(1-2): 119-29.
- Horowitz, A. et Simons, M. (2008). "Branching morphogenesis." Circ Res **103**(8): 784-95.
- Hsieh, J. C., Kodjabachian, L., et al. (1999). "A new secreted protein that binds to Wnt proteins and inhibits their activities." Nature **398**(6726): 431-6.
- Hsieh, J. C., Rattner, A., et al. (1999). "Biochemical characterization of Wnt-frizzled interactions using a soluble, biologically active vertebrate Wnt protein." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(7): 3546-51.

- Hsieh, J. K., Yap, D., et al. (2002). "Novel function of the cyclin A binding site of E2F in regulating p53-induced apoptosis in response to DNA damage." *Mol Cell Biol* **22**(1): 78-93.
- Hsieh, M., Boerboom, D., et al. (2005). "Mice null for Frizzled4 (Fzd4^{-/-}) are infertile and exhibit impaired corpora lutea formation and function." *Biol Reprod* **73**(6): 1135-46.
- Huang, H. C. et Klein, P. S. (2004). "The Frizzled family: receptors for multiple signal transduction pathways." *Genome Biol* **5**(7): 234.
- Huelsken, J. et Birchmeier, W. (2001). "New aspects of Wnt signaling pathways in higher vertebrates." *Curr Opin Genet Dev* **11**(5): 547-53.
- Hughes, T. A. et Brady, H. J. (2005). "Cross-talk between pRb/E2F and Wnt/beta-catenin pathways: E2F1 induces axin2 leading to repression of Wnt signalling and to increased cell death." *Exp Cell Res* **303**(1): 32-46.
- Hughes, T. A. et Brady, H. J. (2005). "E2F1 up-regulates the expression of the tumour suppressor axin2 both by activation of transcription and by mRNA stabilisation." *Biochem Biophys Res Commun* **329**(4): 1267-74.
- Hung, S. C., Pochampally, R. R., et al. (2007). "Angiogenic effects of human multipotent stromal cell conditioned medium activate the PI3K-Akt pathway in hypoxic endothelial cells to inhibit apoptosis, increase survival, and stimulate angiogenesis." *Stem Cells* **25**(9): 2363-70.
- Ilan, N., Mahooti, S., et al. (1999). "PECAM-1 (CD31) functions as a reservoir for and a modulator of tyrosine-phosphorylated beta-catenin." *J Cell Sci* **112 Pt 18**: 3005-14.
- Ishikawa, T., Tamai, Y., et al. (2001). "Mouse Wnt receptor gene Fzd5 is essential for yolk sac and placental angiogenesis." *Development* **128**(1): 25-33.
- Ishitani, T., Ninomiya-Tsuji, J., et al. (1999). "The TAK1-NLK-MAPK-related pathway antagonizes signalling between beta-catenin and transcription factor TCF." *Nature* **399**(6738): 798-802.
- Isono, K., Nemoto, K., et al. (2006). "Overlapping roles for homeodomain-interacting protein kinases hipk1 and hipk2 in the mediation of cell growth in response to morphogenetic and genotoxic signals." *Mol Cell Biol* **26**(7): 2758-71.
- Israsena, N., Hu, M., et al. (2004). "The presence of FGF2 signaling determines whether beta-catenin exerts effects on proliferation or neuronal differentiation of neural stem cells." *Dev Biol* **268**(1): 220-31.
- Itasaki, N., Jones, C. M., et al. (2003). "Wise, a context-dependent activator and inhibitor of Wnt signalling." *Development* **130**(18): 4295-305.
- Itoh, K., Antipova, A., et al. (2000). "Interaction of dishevelled and Xenopus axin-related protein is required for wnt signal transduction." *Mol Cell Biol* **20**(6): 2228-38.
- Itoh, K., Brott, B. K., et al. (2005). "Nuclear localization is required for Dishevelled function in Wnt/beta-catenin signaling." *J Biol* **4**(1): 3.
- Ivanovic, Z. (2009). "Hypoxia or in situ normoxia: The stem cell paradigm." *J Cell Physiol* **219**(2): 271-5.
- Iwamoto, M., Ahnen, D. J., et al. (2000). "Expression of beta-catenin and full-length APC protein in normal and neoplastic colonic tissues." *Carcinogenesis* **21**(11): 1935-40.
- Jain, R. K. (2003). "Molecular regulation of vessel maturation." *Nat Med* **9**(6): 685-93.
- Jakobsson, L., Domogatskaya, A., et al. (2008). "Laminin deposition is dispensable for vasculogenesis but regulates blood vessel diameter independent of flow." *Faseb J* **22**(5): 1530-9.
- Jaspard, B., Couffignal, T., et al. (2000). "Expression pattern of mouse sFRP-1 and mWnt-8 gene during heart morphogenesis." *Mech Dev* **90**(2): 263-7.
- Javerzat, S., Auguste, P., et al. (2002). "The role of fibroblast growth factors in vascular development." *Trends Mol Med* **8**(10): 483-9.

- Jeays-Ward, K., Hoyle, C., et al. (2003). "Endothelial and steroidogenic cell migration are regulated by WNT4 in the developing mammalian gonad." *Development* **130**(16): 3663-70.
- Jenny, A., Darken, R. S., et al. (2003). "Prickle and Strabismus form a functional complex to generate a correct axis during planar cell polarity signaling." *Embo J* **22**(17): 4409-20.
- Jenny, A., Reynolds-Kenneally, J., et al. (2005). "Diego and Prickle regulate Frizzled planar cell polarity signalling by competing for Dishevelled binding." *Nat Cell Biol* **7**(7): 691-7.
- Jho, E., Lomvardas, S., et al. (1999). "A GSK3beta phosphorylation site in axin modulates interaction with beta-catenin and Tcf-mediated gene expression." *Biochem Biophys Res Commun* **266**(1): 28-35.
- Jiang, M., Wang, B., et al. (2008). "In vivo enhancement of angiogenesis by adenoviral transfer of HIF-1alpha-modified endothelial progenitor cells (Ad-HIF-1alpha-modified EPC for angiogenesis)." *Int J Biochem Cell Biol* **40**(10): 2284-95.
- Jin, E. J., Lee, S. Y., et al. (2006). "BMP-2-enhanced chondrogenesis involves p38 MAPK-mediated down-regulation of Wnt-7a pathway." *Mol Cells* **22**(3): 353-9.
- Jin, S. W. et Patterson, C. (2009). "The opening act: vasculogenesis and the origins of circulation." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **29**(5): 623-9.
- Johnson, D. G., Schwarz, J. K., et al. (1993). "Expression of transcription factor E2F1 induces quiescent cells to enter S phase." *Nature* **365**(6444): 349-52.
- Jones, S. E. et Jomary, C. (2002). "Secreted Frizzled-related proteins: searching for relationships and patterns." *Bioessays* **24**(9): 811-20.
- Jope, R. S. et Johnson, G. V. (2004). "The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3." *Trends Biochem Sci* **29**(2): 95-102.
- Jordan, B. K., Shen, J. H., et al. (2003). "Wnt4 overexpression disrupts normal testicular vasculature and inhibits testosterone synthesis by repressing steroidogenic factor 1/beta-catenin synergy." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(19): 10866-71.
- Julius, M. A., Schelbert, B., et al. (2000). "Domains of axin and disheveled required for interaction and function in wnt signaling." *Biochem Biophys Res Commun* **276**(3): 1162-9.
- Kaartinen, V., Voncken, J. W., et al. (1995). "Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF-beta 3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction." *Nat Genet* **11**(4): 415-21.
- Kan, M., Wang, F., et al. (1993). "An essential heparin-binding domain in the fibroblast growth factor receptor kinase." *Science* **259**(5103): 1918-21.
- Kanda, S., Miyata, Y., et al. (2004). "Fibroblast growth factor-2-mediated capillary morphogenesis of endothelial cells requires signals via Flt-1/vascular endothelial growth factor receptor-1: possible involvement of c-Akt." *J Biol Chem* **279**(6): 4007-16.
- Kano, M. R., Morishita, Y., et al. (2005). "VEGF-A and FGF-2 synergistically promote neoangiogenesis through enhancement of endogenous PDGF-B-PDGFRbeta signaling." *J Cell Sci* **118**(Pt 16): 3759-68.
- Kashiwakura, Y., Kato, Y., et al. (2003). "Isolation of bone marrow stromal cell-derived smooth muscle cells by a human SM22alpha promoter: in vitro differentiation of putative smooth muscle progenitor cells of bone marrow." *Circulation* **107**(16): 2078-81.
- Kato, M., Patel, M. S., et al. (2002). "Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor." *J Cell Biol* **157**(2): 303-14.

- Kawano, Y. et Kypta, R. (2003). "Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway." J Cell Sci **116**(Pt 13): 2627-34.
- Kaykas, A., Yang-Snyder, J., et al. (2004). "Mutant Frizzled 4 associated with vitreoretinopathy traps wild-type Frizzled in the endoplasmic reticulum by oligomerization." Nat Cell Biol **6**(1): 52-8.
- Keller, R. (2002). "Shaping the vertebrate body plan by polarized embryonic cell movements." Science **298**(5600): 1950-4.
- Khanna, A. (2004). "Concerted effect of transforming growth factor-beta, cyclin inhibitor p21, and c-myc on smooth muscle cell proliferation." Am J Physiol Heart Circ Physiol **286**(3): H1133-40.
- Kibar, Z., Vogan, K. J., et al. (2001). "Ltap, a mammalian homolog of Drosophila Strabismus/Van Gogh, is altered in the mouse neural tube mutant Loop-tail." Nat Genet **28**(3): 251-5.
- Kikuchi, A., Yamamoto, H., et al. (2007). "Multiplicity of the interactions of Wnt proteins and their receptors." Cell Signal **19**(4): 659-71.
- Kinnaird, T., Stabile, E., et al. (2004). "Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms." Circulation **109**(12): 1543-9.
- Kishida, S., Hamao, K., et al. (2007). "Dvl regulates endo- and exocytotic processes through binding to synaptotagmin." Genes Cells **12**(1): 49-61.
- Kishida, S., Yamamoto, H., et al. (1999). "DIX domains of Dvl and axin are necessary for protein interactions and their ability to regulate beta-catenin stability." Mol Cell Biol **19**(6): 4414-22.
- Klingensmith, J., Nusse, R., et al. (1994). "The Drosophila segment polarity gene dishevelled encodes a novel protein required for response to the wingless signal." Genes Dev **8**(1): 118-30.
- Kluk, M. J. et Hla, T. (2002). "Signaling of sphingosine-1-phosphate via the S1P/EDG-family of G-protein-coupled receptors." Biochim Biophys Acta **1582**(1-3): 72-80.
- Koh, W., Mahan, R. D., et al. (2008). "Cdc42- and Rac1-mediated endothelial lumen formation requires Pak2, Pak4 and Par3, and PKC-dependent signaling." J Cell Sci **121**(Pt 7): 989-1001.
- Kohn, A. D. et Moon, R. T. (2005). "Wnt and calcium signaling: beta-catenin-independent pathways." Cell Calcium **38**(3-4): 439-46.
- Koller, M. R., Bender, J. G., et al. (1992). "Reduced oxygen tension increases hematopoiesis in long-term culture of human stem and progenitor cells from cord blood and bone marrow." Exp Hematol **20**(2): 264-70.
- Koller, M. R., Bender, J. G., et al. (1992). "Beneficial effects of reduced oxygen tension and perfusion in long-term hematopoietic cultures." Ann N Y Acad Sci **665**: 105-16.
- Komiya, Y. et Habas, R. (2008). "Wnt signal transduction pathways." Organogenesis **4**(2): 68-75.
- Kondo, H., Hayashi, H., et al. (2003). "Frizzled 4 gene (FZD4) mutations in patients with familial exudative vitreoretinopathy with variable expressivity." Br J Ophthalmol **87**(10): 1291-5.
- Korinek, V., Barker, N., et al. (1998). "Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4." Nat Genet **19**(4): 379-83.
- Kovacevic-Filipovic, M., Petakov, M., et al. (2007). "Interleukin-6 (IL-6) and low O(2) concentration (1%) synergize to improve the maintenance of hematopoietic stem cells (pre-CFC)." J Cell Physiol **212**(1): 68-75.
- Kowalik, T. F., DeGregori, J., et al. (1995). "E2F1 overexpression in quiescent fibroblasts leads to induction of cellular DNA synthesis and apoptosis." J Virol **69**(4): 2491-500.

- Krah, K., Mironov, V., et al. (1994). "Induction of vasculogenesis in quail blastodisc-derived embryoid bodies." Dev Biol **164**(1): 123-32.
- Kramps, T., Peter, O., et al. (2002). "Wnt/wingless signaling requires BCL9/legless-mediated recruitment of pygopus to the nuclear beta-catenin-TCF complex." Cell **109**(1): 47-60.
- Kroll, J. et Waltenberger, J. (1998). "VEGF-A induces expression of eNOS and iNOS in endothelial cells via VEGF receptor-2 (KDR)." Biochem Biophys Res Commun **252**(3): 743-6.
- Krupnik, V. E., Sharp, J. D., et al. (1999). "Functional and structural diversity of the human Dickkopf gene family." Gene **238**(2): 301-13.
- Krylova, O., Messenger, M. J., et al. (2000). "Dishevelled-1 regulates microtubule stability: a new function mediated by glycogen synthase kinase-3beta." J Cell Biol **151**(1): 83-94.
- Kuhl, M., Sheldahl, L. C., et al. (2000). "Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II is stimulated by Wnt and Frizzled homologs and promotes ventral cell fates in Xenopus." J Biol Chem **275**(17): 12701-11.
- Kuninaka, S., Nomura, M., et al. (2005). "The tumor suppressor WARTS activates the Omi / HtrA2-dependent pathway of cell death." Oncogene **24**(34): 5287-98.
- Labbe, E., Lock, L., et al. (2007). "Transcriptional cooperation between the transforming growth factor-beta and Wnt pathways in mammary and intestinal tumorigenesis." Cancer Res **67**(1): 75-84.
- Lacombe, F., Belloc, F., et al. (1988). "Evaluation of four methods of DNA distribution data analysis based on bromodeoxyuridine/DNA bivariate data." Cytometry **9**(3): 245-53.
- Lamaziere, J. M., Lavalley, J., et al. (1993). "Semiquantitative study of the distribution of two cellular antigens by computer-directed color analysis." Lab Invest **68**(2): 248-52.
- Lawrence, P. A., Casal, J., et al. (2004). "Cell interactions and planar polarity in the abdominal epidermis of Drosophila." Development **131**(19): 4651-64.
- Lawson, N. D., Scheer, N., et al. (2001). "Notch signaling is required for arterial-venous differentiation during embryonic vascular development." Development **128**(19): 3675-83.
- Lawson, N. D. et Weinstein, B. M. (2002). "Arteries and veins: making a difference with zebrafish." Nat Rev Genet **3**(9): 674-82.
- le Noble, F., Moyon, D., et al. (2004). "Flow regulates arterial-venous differentiation in the chick embryo yolk sac." Development **131**(2): 361-75.
- Lee, H. S., Lee, D. C., et al. (2006). "STMN2 is a novel target of beta-catenin/TCF-mediated transcription in human hepatoma cells." Biochem Biophys Res Commun **345**(3): 1059-67.
- Lee, J. S., Ishimoto, A., et al. (1999). "Characterization of mouse dishevelled (Dvl) proteins in Wnt/Wingless signaling pathway." J Biol Chem **274**(30): 21464-70.
- Lee, S. M., Tole, S., et al. (2000). "A local Wnt-3a signal is required for development of the mammalian hippocampus." Development **127**(3): 457-67.
- Lee, Y. N., Gao, Y., et al. (2008). "Differential mediation of the Wnt canonical pathway by mammalian Dishevelleds-1, -2, and -3." Cell Signal **20**(2): 443-52.
- Lehoux, S., Castier, Y., et al. (2006). "Molecular mechanisms of the vascular responses to haemodynamic forces." J Intern Med **259**(4): 381-92.
- Lengner, C. J., Lepper, C., et al. (2004). "Primary mouse embryonic fibroblasts: a model of mesenchymal cartilage formation." J Cell Physiol **200**(3): 327-33.
- Leung, D. W., Cachianes, G., et al. (1989). "Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen." Science **246**(4935): 1306-9.
- Levina, E., Oren, M., et al. (2004). "Downregulation of beta-catenin by p53 involves changes in the rate of beta-catenin phosphorylation and Axin dynamics." Oncogene **23**(25): 4444-53.

- Levy, L., Neuveut, C., et al. (2002). "Transcriptional activation of interleukin-8 by beta-catenin-Tcf4." *J Biol Chem* **277**(44): 42386-93.
- Li, L., Yuan, H., et al. (1999). "Dishevelled proteins lead to two signaling pathways. Regulation of LEF-1 and c-Jun N-terminal kinase in mammalian cells." *J Biol Chem* **274**(1): 129-34.
- Li, X., Zhang, Y., et al. (2005). "Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling." *J Biol Chem* **280**(20): 19883-7.
- Liebner, S., Corada, M., et al. (2008). "Wnt/beta-catenin signaling controls development of the blood-brain barrier." *J Cell Biol* **183**(3): 409-17.
- Lijam, N., Paylor, R., et al. (1997). "Social interaction and sensorimotor gating abnormalities in mice lacking Dvl1." *Cell* **90**(5): 895-905.
- Lilien, J. et Balsamo, J. (2005). "The regulation of cadherin-mediated adhesion by tyrosine phosphorylation/dephosphorylation of beta-catenin." *Curr Opin Cell Biol* **17**(5): 459-65.
- Lin, K., Wang, S., et al. (1997). "The cysteine-rich frizzled domain of Frzb-1 is required and sufficient for modulation of Wnt signaling." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(21): 11196-200.
- Lin, X. et Perrimon, N. (1999). "Dally cooperates with Drosophila Frizzled 2 to transduce Wingless signalling." *Nature* **400**(6741): 281-4.
- Lindahl, P., Bostrom, H., et al. (1999). "Role of platelet-derived growth factors in angiogenesis and alveogenesis." *Curr Top Pathol* **93**: 27-33.
- Lindahl, P., Hellstrom, M., et al. (1998). "Endothelial-perivascular cell signaling in vascular development: lessons from knockout mice." *Curr Opin Lipidol* **9**(5): 407-11.
- Liu, C., Li, Y., et al. (2002). "Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism." *Cell* **108**(6): 837-47.
- Liu, C. et Nathans, J. (2008). "An essential role for frizzled 5 in mammalian ocular development." *Development* **135**(21): 3567-76.
- Lobov, I. B., Renard, R. A., et al. (2007). "Delta-like ligand 4 (Dll4) is induced by VEGF as a negative regulator of angiogenic sprouting." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(9): 3219-24.
- Logan, C. Y. et Nusse, R. (2004). "The Wnt signaling pathway in development and disease." *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**: 781-810.
- Loufrani, L. et Henrion, D. (2008). "Role of the cytoskeleton in flow (shear stress)-induced dilation and remodeling in resistance arteries." *Med Biol Eng Comput* **46**(5): 451-60.
- Loughna, S. et Sato, T. N. (2001). "Angiopoietin and Tie signaling pathways in vascular development." *Matrix Biol* **20**(5-6): 319-25.
- Louie, S. H., Yang, X. Y., et al. (2009). "Modulation of the beta-catenin signaling pathway by the dishevelled-associated protein Hipk1." *PLoS One* **4**(2): e4310.
- Lu, H., Xu, X., et al. (2007). "Combinatorial protein therapy of angiogenic and arteriogenic factors remarkably improves collateralogenesis and cardiac function in pigs." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(29): 12140-5.
- Lu, X., Le Noble, F., et al. (2004). "The netrin receptor UNC5B mediates guidance events controlling morphogenesis of the vascular system." *Nature* **432**(7014): 179-86.
- Luo, J., Chen, J., et al. (2007). "Wnt signaling and human diseases: what are the therapeutic implications?" *Lab Invest* **87**(2): 97-103.
- Lyden, D., Hattori, K., et al. (2001). "Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth." *Nat Med* **7**(11): 1194-201.
- Lyden, D., Young, A. Z., et al. (1999). "Id1 and Id3 are required for neurogenesis, angiogenesis and vascularization of tumour xenografts." *Nature* **401**(6754): 670-7.

- Ma, J., Wang, Q., et al. (2007). "MCP-1 mediates TGF-beta-induced angiogenesis by stimulating vascular smooth muscle cell migration." *Blood* **109**(3): 987-94.
- MacDonald, B. T., Tamai, K., et al. (2009). "Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases." *Dev Cell* **17**(1): 9-26.
- Maisonpierre, P. C., Suri, C., et al. (1997). "Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis." *Science* **277**(5322): 55-60.
- Makino, S., Fukuda, K., et al. (1999). "Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro." *J Clin Invest* **103**(5): 697-705.
- Malaterre, J., Ramsay, R. G., et al. (2007). "Wnt-Frizzled signalling and the many paths to neural development and adult brain homeostasis." *Front Biosci* **12**: 492-506.
- Malhotra, S. et Kincade, P. W. (2009). "Wnt-related molecules and signaling pathway equilibrium in hematopoiesis." *Cell Stem Cell* **4**(1): 27-36.
- Mann, B., Gelos, M., et al. (1999). "Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(4): 1603-8.
- Mao, B., Wu, W., et al. (2002). "Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling." *Nature* **417**(6889): 664-7.
- Mao, B., Wu, W., et al. (2001). "LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins." *Nature* **411**(6835): 321-5.
- Mao, C., Malek, O. T., et al. (2000). "Differential expression of rat frizzled-related frzb-1 and frizzled receptor fz1 and fz2 genes in the rat aorta after balloon injury." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**(1): 43-51.
- Mao, J., Wang, J., et al. (2001). "Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway." *Mol Cell* **7**(4): 801-9.
- Maretto, S., Cordenonsi, M., et al. (2003). "Mapping Wnt/beta-catenin signaling during mouse development and in colorectal tumors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(6): 3299-304.
- Marlow, F., Topczewski, J., et al. (2002). "Zebrafish Rho kinase 2 acts downstream of Wnt11 to mediate cell polarity and effective convergence and extension movements." *Curr Biol* **12**(11): 876-84.
- Masaki, I., Yonemitsu, Y., et al. (2002). "Angiogenic gene therapy for experimental critical limb ischemia: acceleration of limb loss by overexpression of vascular endothelial growth factor 165 but not of fibroblast growth factor-2." *Circ Res* **90**(9): 966-73.
- Masckauchan, T. N., Agalliu, D., et al. (2006). "Wnt5a signaling induces proliferation and survival of endothelial cells in vitro and expression of MMP-1 and Tie-2." *Mol Biol Cell* **17**(12): 5163-72.
- Masckauchan, T. N. et Kitajewski, J. (2006). "Wnt/Frizzled signaling in the vasculature: new angiogenic factors in sight." *Physiology (Bethesda)* **21**: 181-8.
- Masckauchan, T. N., Shawber, C. J., et al. (2005). "Wnt/beta-catenin signaling induces proliferation, survival and interleukin-8 in human endothelial cells." *Angiogenesis* **8**(1): 43-51.
- Massague, J. et Chen, Y. G. (2000). "Controlling TGF-beta signaling." *Genes Dev* **14**(6): 627-44.
- Massague, J. et Gomis, R. R. (2006). "The logic of TGFbeta signaling." *FEBS Lett* **580**(12): 2811-20.
- McMahon, A. P. et Moon, R. T. (1989). "Ectopic expression of the proto-oncogene int-1 in *Xenopus* embryos leads to duplication of the embryonic axis." *Cell* **58**(6): 1075-84.
- Melkonyan, H. S., Chang, W. C., et al. (1997). "SARPs: a family of secreted apoptosis-related proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(25): 13636-41.

- Mikels, A. J. et Nusse, R. (2006). "Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context." *PLoS Biol* **4**(4): e115.
- Miller, J. R. (2002). "The Wnts." *Genome Biol* **3**(1): REVIEWS3001.
- Miller, J. R., Rowling, B. A., et al. (1999). "Establishment of the dorsal-ventral axis in *Xenopus* embryos coincides with the dorsal enrichment of dishevelled that is dependent on cortical rotation." *J Cell Biol* **146**(2): 427-37.
- Miura, M., Miura, Y., et al. (2006). "Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation." *Stem Cells* **24**(4): 1095-103.
- Miyazono, K., ten Dijke, P., et al. (2000). "TGF-beta signaling by Smad proteins." *Adv Immunol* **75**: 115-57.
- Mlodzik, M. (2002). "Planar cell polarization: do the same mechanisms regulate *Drosophila* tissue polarity and vertebrate gastrulation?" *Trends Genet* **18**(11): 564-71.
- Mohammadi, M., Dionne, C. A., et al. (1992). "Point mutation in FGF receptor eliminates phosphatidylinositol hydrolysis without affecting mitogenesis." *Nature* **358**(6388): 681-4.
- Mok, H., Shin, H., et al. (2002). "Association of the kinesin superfamily motor protein KIF1Balpha with postsynaptic density-95 (PSD-95), synapse-associated protein-97, and synaptic scaffolding molecule PSD-95/discs large/zona occludens-1 proteins." *J Neurosci* **22**(13): 5253-8.
- Molenaar, M., van de Wetering, M., et al. (1996). "XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos." *Cell* **86**(3): 391-9.
- Monkley, S. J., Delaney, S. J., et al. (1996). "Targeted disruption of the Wnt2 gene results in placentation defects." *Development* **122**(11): 3343-53.
- Montcouquiol, M., Crenshaw, E. B., 3rd, et al. (2006). "Noncanonical Wnt signaling and neural polarity." *Annu Rev Neurosci* **29**: 363-86.
- Montcouquiol, M., Rachel, R. A., et al. (2003). "Identification of Vangl2 and Scrb1 as planar polarity genes in mammals." *Nature* **423**(6936): 173-7.
- Montcouquiol, M., Sans, N., et al. (2006). "Asymmetric localization of Vangl2 and Fz3 indicate novel mechanisms for planar cell polarity in mammals." *J Neurosci* **26**(19): 5265-75.
- Montesano, R., Vassalli, J. D., et al. (1986). "Basic fibroblast growth factor induces angiogenesis in vitro." *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(19): 7297-301.
- Moon, R. T., Brown, J. D., et al. (1997). "WNTs modulate cell fate and behavior during vertebrate development." *Trends Genet* **13**(4): 157-62.
- Moon, R. T., Campbell, R. M., et al. (1993). "Xwnt-5A: a maternal Wnt that affects morphogenetic movements after overexpression in embryos of *Xenopus laevis*." *Development* **119**(1): 97-111.
- Moon, R. T., Kohn, A. D., et al. (2004). "WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies." *Nat Rev Genet* **5**(9): 691-701.
- Moriguchi, T., Kawachi, K., et al. (1999). "Distinct domains of mouse dishevelled are responsible for the c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase activation and the axis formation in vertebrates." *J Biol Chem* **274**(43): 30957-62.
- Morris, E. J., Ji, J. Y., et al. (2008). "E2F1 represses beta-catenin transcription and is antagonized by both pRB and CDK8." *Nature* **455**(7212): 552-6.
- Moustakas, A., Souchelnytskyi, S., et al. (2001). "Smad regulation in TGF-beta signal transduction." *J Cell Sci* **114**(Pt 24): 4359-69.
- Muguruma, Y., Yahata, T., et al. (2006). "Reconstitution of the functional human hematopoietic microenvironment derived from human mesenchymal stem cells in the murine bone marrow compartment." *Blood* **107**(5): 1878-87.

- Murakami, M., Nguyen, L. T., et al. (2008). "The FGF system has a key role in regulating vascular integrity." *J Clin Invest* **118**(10): 3355-66.
- Murakami, S., Kan, M., et al. (2000). "Up-regulation of the chondrogenic Sox9 gene by fibroblast growth factors is mediated by the mitogen-activated protein kinase pathway." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(3): 1113-8.
- Murohara, T., Asahara, T., et al. (1998). "Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia." *J Clin Invest* **101**(11): 2567-78.
- Myers, C., Charboneau, A., et al. (2000). "Homeobox B3 promotes capillary morphogenesis and angiogenesis." *J Cell Biol* **148**(2): 343-51.
- Myers, D. C., Sepich, D. S., et al. (2002). "Convergence and extension in vertebrate gastrulae: cell movements according to or in search of identity?" *Trends Genet* **18**(9): 447-55.
- Naccache, S. N., Hasson, T., et al. (2006). "Binding of internalized receptors to the PDZ domain of GIPC/synectin recruits myosin VI to endocytic vesicles." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(34): 12735-40.
- Nagaya, N., Kangawa, K., et al. (2005). "Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy." *Circulation* **112**(8): 1128-35.
- Nahle, Z., Polakoff, J., et al. (2002). "Direct coupling of the cell cycle and cell death machinery by E2F." *Nat Cell Biol* **4**(11): 859-64.
- Nam, J. S., Turcotte, T. J., et al. (2006). "Mouse cristin/R-spondin family proteins are novel ligands for the Frizzled 8 and LRP6 receptors and activate beta-catenin-dependent gene expression." *J Biol Chem* **281**(19): 13247-57.
- Nelson, A. R., Fingleton, B., et al. (2000). "Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications." *J Clin Oncol* **18**(5): 1135-49.
- Nelson, W. J. et Nusse, R. (2004). "Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways." *Science* **303**(5663): 1483-7.
- Neth, P., Ries, C., et al. (2007). "The Wnt signal transduction pathway in stem cells and cancer cells: influence on cellular invasion." *Stem Cell Rev* **3**(1): 18-29.
- Nguyen, T. H., Eichmann, A., et al. (2006). "Dynamics of vascular branching morphogenesis: the effect of blood and tissue flow." *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* **73**(6 Pt 1): 061907.
- Nickel, W. (2005). "Unconventional secretory routes: direct protein export across the plasma membrane of mammalian cells." *Traffic* **6**(8): 607-14.
- Niehrs, C. (2006). "Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators." *Oncogene* **25**(57): 7469-81.
- Nishita, M., Hashimoto, M. K., et al. (2000). "Interaction between Wnt and TGF-beta signalling pathways during formation of Spemann's organizer." *Nature* **403**(6771): 781-5.
- Nissen, L. J., Cao, R., et al. (2007). "Angiogenic factors FGF2 and PDGF-BB synergistically promote murine tumor neovascularization and metastasis." *J Clin Invest* **117**(10): 2766-77.
- Nobes, C. D. et Hall, A. (1999). "Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement." *J Cell Biol* **144**(6): 1235-44.
- Noguera-Troise, I., Daly, C., et al. (2006). "Blockade of Dll4 inhibits tumour growth by promoting non-productive angiogenesis." *Nature* **444**(7122): 1032-7.
- Noiseux, N., Gnecci, M., et al. (2006). "Mesenchymal stem cells overexpressing Akt dramatically repair infarcted myocardium and improve cardiac function despite infrequent cellular fusion or differentiation." *Mol Ther* **14**(6): 840-50.
- O'Reilly, M. S., Boehm, T., et al. (1997). "Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth." *Cell* **88**(2): 277-85.

- O'Reilly, M. S., Holmgren, L., et al. (1994). "Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma." Cell **79**(2): 315-28.
- Olsen, S. K., Garbi, M., et al. (2003). "Fibroblast growth factor (FGF) homologous factors share structural but not functional homology with FGFs." J Biol Chem **278**(36): 34226-36.
- Oses, P., Renault, M. A., et al. (2009). "Mapping 3-Dimensional Neovessel Organization Steps Using Micro-Computed Tomography in a Murine Model of Hindlimb Ischemia." Arterioscler Thromb Vasc Biol.
- Oshima, M., Oshima, H., et al. (1996). "TGF-beta receptor type II deficiency results in defects of yolk sac hematopoiesis and vasculogenesis." Dev Biol **179**(1): 297-302.
- Ossipova, O., Dhawan, S., et al. (2005). "Distinct PAR-1 proteins function in different branches of Wnt signaling during vertebrate development." Dev Cell **8**(6): 829-41.
- Ostman, A. (2004). "PDGF receptors-mediators of autocrine tumor growth and regulators of tumor vasculature and stroma." Cytokine Growth Factor Rev **15**(4): 275-86.
- Oswald, J., Boxberger, S., et al. (2004). "Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro." Stem Cells **22**(3): 377-84.
- Ota, T., Fujii, M., et al. (2002). "Targets of transcriptional regulation by two distinct type I receptors for transforming growth factor-beta in human umbilical vein endothelial cells." J Cell Physiol **193**(3): 299-318.
- Pan, W. J., Pang, S. Z., et al. (2004). "Characterization of function of three domains in dishevelled-1: DEP domain is responsible for membrane translocation of dishevelled-1." Cell Res **14**(4): 324-30.
- Pandur, P., Lasche, M., et al. (2002). "Wnt-11 activation of a non-canonical Wnt signalling pathway is required for cardiogenesis." Nature **418**(6898): 636-41.
- Park, M. et Moon, R. T. (2002). "The planar cell-polarity gene stbm regulates cell behaviour and cell fate in vertebrate embryos." Nat Cell Biol **4**(1): 20-5.
- Park, T. J., Gray, R. S., et al. (2005). "Subcellular localization and signaling properties of dishevelled in developing vertebrate embryos." Curr Biol **15**(11): 1039-44.
- Parker, P. J. et Murray-Rust, J. (2004). "PKC at a glance." J Cell Sci **117**(Pt 2): 131-2.
- Parmalee, N. L. et Kitajewski, J. (2008). "Wnt signaling in angiogenesis." Curr Drug Targets **9**(7): 558-64.
- Parsons-Wingenter, P., Elliott, K. E., et al. (2000). "Fibroblast growth factor-2 selectively stimulates angiogenesis of small vessels in arterial tree." Arterioscler Thromb Vasc Biol **20**(5): 1250-6.
- Partanen, J., Vainikka, S., et al. (1992). "Diverse receptors for fibroblast growth factors." Prog Growth Factor Res **4**(1): 69-83.
- Patel, B. N. et Van Vactor, D. L. (2002). "Axon guidance: the cytoplasmic tail." Curr Opin Cell Biol **14**(2): 221-9.
- Peifer, M. et Polakis, P. (2000). "Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis--a look outside the nucleus." Science **287**(5458): 1606-9.
- Penton, A., Wodarz, A., et al. (2002). "A mutational analysis of dishevelled in Drosophila defines novel domains in the dishevelled protein as well as novel suppressing alleles of axin." Genetics **161**(2): 747-62.
- Pepper, M. S. (1997). "Transforming growth factor-beta: vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity." Cytokine Growth Factor Rev **8**(1): 21-43.
- Pepper, M. S. (2001). "Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **21**(7): 1104-17.
- Peters, J. M., McKay, R. M., et al. (1999). "Casein kinase I transduces Wnt signals." Nature **401**(6751): 345-50.

- Phillips, A. C., Ernst, M. K., et al. (1999). "E2F-1 potentiates cell death by blocking antiapoptotic signaling pathways." *Mol Cell* **4**(5): 771-81.
- Phng, L. K., Potente, M., et al. (2009). "Nrap coordinates endothelial Notch and Wnt signaling to control vessel density in angiogenesis." *Dev Cell* **16**(1): 70-82.
- Pickering, J. G., Uniyal, S., et al. (1997). "Fibroblast growth factor-2 potentiates vascular smooth muscle cell migration to platelet-derived growth factor: upregulation of alpha2beta1 integrin and disassembly of actin filaments." *Circ Res* **80**(5): 627-37.
- Piek, E., Heldin, C. H., et al. (1999). "Specificity, diversity, and regulation in TGF-beta superfamily signaling." *Faseb J* **13**(15): 2105-24.
- Pierce, A. M., Gimenez-Conti, I. B., et al. (1998). "Increased E2F1 activity induces skin tumors in mice heterozygous and nullizygous for p53." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(15): 8858-63.
- Pinson, K. I., Brennan, J., et al. (2000). "An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice." *Nature* **407**(6803): 535-8.
- Polverini, P. J., Cotran, P. S., et al. (1977). "Activated macrophages induce vascular proliferation." *Nature* **269**(5631): 804-6.
- Potier, E., Ferreira, E., et al. (2007). "Hypoxia affects mesenchymal stromal cell osteogenic differentiation and angiogenic factor expression." *Bone* **40**(4): 1078-87.
- Povelones, M. et Nusse, R. (2005). "The role of the cysteine-rich domain of Frizzled in Wingless-Armadillo signaling." *Embo J* **24**(19): 3493-503.
- Prats, H., Kaghad, M., et al. (1989). "High molecular mass forms of basic fibroblast growth factor are initiated by alternative CUG codons." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(6): 1836-40.
- Presta, M., Dell'Era, P., et al. (2005). "Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis." *Cytokine Growth Factor Rev* **16**(2): 159-78.
- Prior, B. M., Yang, H. T., et al. (2004). "What makes vessels grow with exercise training?" *J Appl Physiol* **97**(3): 1119-28.
- Pugh, C. W. et Ratcliffe, P. J. (2003). "Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system." *Nat Med* **9**(6): 677-84.
- Rajantie, I., Ilmonen, M., et al. (2004). "Adult bone marrow-derived cells recruited during angiogenesis comprise precursors for periendothelial vascular mural cells." *Blood* **104**(7): 2084-6.
- Ramirez-Bergeron, D. L., Runge, A., et al. (2006). "HIF-dependent hematopoietic factors regulate the development of the embryonic vasculature." *Dev Cell* **11**(1): 81-92.
- Rattner, A., Hsieh, J. C., et al. (1997). "A family of secreted proteins contains homology to the cysteine-rich ligand-binding domain of frizzled receptors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(7): 2859-63.
- Reddi, A. H. (2001). "Interplay between bone morphogenetic proteins and cognate binding proteins in bone and cartilage development: noggin, chordin and DAN." *Arthritis Res* **3**(1): 1-5.
- Rehm, H. L., Zhang, D. S., et al. (2002). "Vascular defects and sensorineural deafness in a mouse model of Norrie disease." *J Neurosci* **22**(11): 4286-92.
- Reichsman, F., Smith, L., et al. (1996). "Glycosaminoglycans can modulate extracellular localization of the wingless protein and promote signal transduction." *J Cell Biol* **135**(3): 819-27.
- Reya, T. et Clevers, H. (2005). "Wnt signalling in stem cells and cancer." *Nature* **434**(7035): 843-50.
- Reya, T., Duncan, A. W., et al. (2003). "A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells." *Nature* **423**(6938): 409-14.

- Rhodes, J. M. et Simons, M. (2007). "The extracellular matrix and blood vessel formation: not just a scaffold." J Cell Mol Med **11**(2): 176-205.
- Ridley, A. J. (2001). "Rho family proteins: coordinating cell responses." Trends Cell Biol **11**(12): 471-7.
- Risau, W. (1997). "Mechanisms of angiogenesis." Nature **386**(6626): 671-4.
- Roberts, D. M., Slep, K. C., et al. (2007). "It takes more than two to tango: Dishevelled polymerization and Wnt signaling." Nat Struct Mol Biol **14**(6): 463-5.
- Robitaille, J., MacDonald, M. L., et al. (2002). "Mutant frizzled-4 disrupts retinal angiogenesis in familial exudative vitreoretinopathy." Nat Genet **32**(2): 326-30.
- Rodriguez-Esteban, C., Capdevila, J., et al. (2001). "Wnt signaling and PKA control Nodal expression and left-right determination in the chick embryo." Development **128**(16): 3189-95.
- Rodriguez, J., Esteve, P., et al. (2005). "SFRP1 regulates the growth of retinal ganglion cell axons through the Fz2 receptor." Nat Neurosci **8**(10): 1301-9.
- Roose, J., Molenaar, M., et al. (1998). "The Xenopus Wnt effector XTcf-3 interacts with Groucho-related transcriptional repressors." Nature **395**(6702): 608-12.
- Rothbacher, U., Laurent, M. N., et al. (2000). "Dishevelled phosphorylation, subcellular localization and multimerization regulate its role in early embryogenesis." Embo J **19**(5): 1010-22.
- Rousseau, B., Dubayle, D., et al. (2000). "Neural and angiogenic defects in eyes of transgenic mice expressing a dominant-negative FGF receptor in the pigmented cells." Exp Eye Res **71**(4): 395-404.
- Rubinfeld, B., Tice, D. A., et al. (2001). "Axin-dependent phosphorylation of the adenomatous polyposis coli protein mediated by casein kinase Iepsilon." J Biol Chem **276**(42): 39037-45.
- Rubio, D., Garcia-Castro, J., et al. (2005). "Spontaneous human adult stem cell transformation." Cancer Res **65**(8): 3035-9.
- Ruhrberg, C., Gerhardt, H., et al. (2002). "Spatially restricted patterning cues provided by heparin-binding VEGF-A control blood vessel branching morphogenesis." Genes Dev **16**(20): 2684-98.
- Rulifson, E. J., Wu, C. H., et al. (2000). "Pathway specificity by the bifunctional receptor frizzled is determined by affinity for wingless." Mol Cell **6**(1): 117-26.
- Rupp, P. A. et Little, C. D. (2001). "Integrins in vascular development." Circ Res **89**(7): 566-72.
- Sainson, R. C., Aoto, J., et al. (2005). "Cell-autonomous notch signaling regulates endothelial cell branching and proliferation during vascular tubulogenesis." Faseb J **19**(8): 1027-9.
- Sainson, R. C., Johnston, D. A., et al. (2008). "TNF primes endothelial cells for angiogenic sprouting by inducing a tip cell phenotype." Blood **111**(10): 4997-5007.
- Sakanaka, C., Leong, P., et al. (1999). "Casein kinase Iepsilon in the wnt pathway: regulation of beta-catenin function." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(22): 12548-52.
- Sato, Y., Teruyama, K., et al. (2001). "Role of transcription factors in angiogenesis: Ets-1 promotes angiogenesis as well as endothelial apoptosis." Ann N Y Acad Sci **947**: 117-23.
- Saucier, C., Khoury, H., et al. (2004). "The Shc adaptor protein is critical for VEGF induction by Met/HGF and ErbB2 receptors and for early onset of tumor angiogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(8): 2345-50.
- Schlessinger, J. (2000). "New roles for Src kinases in control of cell survival and angiogenesis." Cell **100**(3): 293-6.
- Scholz, D., Cai, W. J., et al. (2001). "Arteriogenesis, a new concept of vascular adaptation in occlusive disease." Angiogenesis **4**(4): 247-57.

- Scholz, D., Ito, W., et al. (2000). "Ultrastructure and molecular histology of rabbit hind-limb collateral artery growth (arteriogenesis)." *Virchows Arch* **436**(3): 257-70.
- Schulte, G. et Bryja, V. (2007). "The Frizzled family of unconventional G-protein-coupled receptors." *Trends Pharmacol Sci* **28**(10): 518-25.
- Schwarz-Romond, T., Metcalfe, C., et al. (2007). "Dynamic recruitment of axin by Dishevelled protein assemblies." *J Cell Sci* **120**(Pt 14): 2402-12.
- Seay, U., Sedding, D., et al. (2005). "Transforming growth factor-beta-dependent growth inhibition in primary vascular smooth muscle cells is p38-dependent." *J Pharmacol Exp Ther* **315**(3): 1005-12.
- Seghezzi, G., Patel, S., et al. (1998). "Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries: an autocrine mechanism contributing to angiogenesis." *J Cell Biol* **141**(7): 1659-73.
- Seifert, J. R. et Mlodzik, M. (2007). "Frizzled/PCP signalling: a conserved mechanism regulating cell polarity and directed motility." *Nat Rev Genet* **8**(2): 126-38.
- Semenov, M., Tamai, K., et al. (2005). "SOST is a ligand for LRP5/LRP6 and a Wnt signaling inhibitor." *J Biol Chem* **280**(29): 26770-5.
- Semenov, M. V. et Snyder, M. (1997). "Human dishevelled genes constitute a DHR-containing multigene family." *Genomics* **42**(2): 302-10.
- Semenov, M. V., Tamai, K., et al. (2001). "Head inducer Dickkopf-1 is a ligand for Wnt coreceptor LRP6." *Curr Biol* **11**(12): 951-61.
- Shake, J. G., Gruber, P. J., et al. (2002). "Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects." *Ann Thorac Surg* **73**(6): 1919-25; discussion 1926.
- Shalaby, F., Rossant, J., et al. (1995). "Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice." *Nature* **376**(6535): 62-6.
- Sheikh, F., Sontag, D. P., et al. (2001). "Overexpression of FGF-2 increases cardiac myocyte viability after injury in isolated mouse hearts." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **280**(3): H1039-50.
- Sheldahl, L. C., Slusarski, D. C., et al. (2003). "Dishevelled activates Ca²⁺ flux, PKC, and CamKII in vertebrate embryos." *J Cell Biol* **161**(4): 769-77.
- Shibamoto, S., Higano, K., et al. (1998). "Cytoskeletal reorganization by soluble Wnt-3a protein signalling." *Genes Cells* **3**(10): 659-70.
- Shimizu, H., Julius, M. A., et al. (1997). "Transformation by Wnt family proteins correlates with regulation of beta-catenin." *Cell Growth Differ* **8**(12): 1349-58.
- Shing, Y., Folkman, J., et al. (1984). "Heparin affinity: purification of a tumor-derived capillary endothelial cell growth factor." *Science* **223**(4642): 1296-9.
- Shiojima, I. et Walsh, K. (2002). "Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis." *Circ Res* **90**(12): 1243-50.
- Shiota, M., Heike, T., et al. (2007). "Isolation and characterization of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells with myogenic and neuronal properties." *Exp Cell Res* **313**(5): 1008-23.
- Shu, W., Jiang, Y. Q., et al. (2002). "Wnt7b regulates mesenchymal proliferation and vascular development in the lung." *Development* **129**(20): 4831-42.
- Slusarski, D. C., Yang-Snyder, J., et al. (1997). "Modulation of embryonic intracellular Ca²⁺ signaling by Wnt-5A." *Dev Biol* **182**(1): 114-20.
- Smalley, M. J., Sara, E., et al. (1999). "Interaction of axin and Dvl-2 proteins regulates Dvl-2-stimulated TCF-dependent transcription." *Embo J* **18**(10): 2823-35.
- Smallwood, P. M., Williams, J., et al. (2007). "Mutational analysis of Norrin-Frizzled4 recognition." *J Biol Chem* **282**(6): 4057-68.

- Soncin, F., Mattot, V., et al. (2003). "VE-statin, an endothelial repressor of smooth muscle cell migration." *Embo J* **22**(21): 5700-11.
- Song, D. H., Dominguez, I., et al. (2003). "CK2 phosphorylation of the armadillo repeat region of beta-catenin potentiates Wnt signaling." *J Biol Chem* **278**(26): 24018-25.
- Song, S., Ewald, A. J., et al. (2005). "PDGFRbeta+ perivascular progenitor cells in tumours regulate pericyte differentiation and vascular survival." *Nat Cell Biol* **7**(9): 870-9.
- Sottile, J. (2004). "Regulation of angiogenesis by extracellular matrix." *Biochim Biophys Acta* **1654**(1): 13-22.
- Stalmans, I., Ng, Y. S., et al. (2002). "Arteriolar and venular patterning in retinas of mice selectively expressing VEGF isoforms." *J Clin Invest* **109**(3): 327-36.
- Stenman, J. M., Rajagopal, J., et al. (2008). "Canonical Wnt signaling regulates organ-specific assembly and differentiation of CNS vasculature." *Science* **322**(5905): 1247-50.
- Stevens, C. et La Thangue, N. B. (2004). "The emerging role of E2F-1 in the DNA damage response and checkpoint control." *DNA Repair (Amst)* **3**(8-9): 1071-9.
- Stringer, S. E. (2006). "The role of heparan sulphate proteoglycans in angiogenesis." *Biochem Soc Trans* **34**(Pt 3): 451-3.
- Strutt, D. (2003). "Frizzled signalling and cell polarisation in Drosophila and vertebrates." *Development* **130**(19): 4501-13.
- Strutt, D. I. (2001). "Asymmetric localization of frizzled and the establishment of cell polarity in the Drosophila wing." *Mol Cell* **7**(2): 367-75.
- Strutt, D. I., Weber, U., et al. (1997). "The role of RhoA in tissue polarity and Frizzled signalling." *Nature* **387**(6630): 292-5.
- Suchting, S., Freitas, C., et al. (2007). "The Notch ligand Delta-like 4 negatively regulates endothelial tip cell formation and vessel branching." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(9): 3225-30.
- Sun, T. Q., Lu, B., et al. (2001). "PAR-1 is a Dishevelled-associated kinase and a positive regulator of Wnt signalling." *Nat Cell Biol* **3**(7): 628-36.
- Suri, C., Jones, P. F., et al. (1996). "Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis." *Cell* **87**(7): 1171-80.
- Suri, C., McClain, J., et al. (1998). "Increased vascularization in mice overexpressing angiopoietin-1." *Science* **282**(5388): 468-71.
- Sussman, D. J., Klingensmith, J., et al. (1994). "Isolation and characterization of a mouse homolog of the Drosophila segment polarity gene dishevelled." *Dev Biol* **166**(1): 73-86.
- Swain, R. K., Katoh, M., et al. (2005). "Xenopus frizzled-4S, a splicing variant of Xfz4 is a context-dependent activator and inhibitor of Wnt/beta-catenin signaling." *Cell Commun Signal* **3**: 12.
- Tagliafico, E., Brunelli, S., et al. (2004). "TGFbeta/BMP activate the smooth muscle/bone differentiation programs in mesoangioblasts." *J Cell Sci* **117**(Pt 19): 4377-88.
- Tahinci, E., Thorne, C. A., et al. (2007). "Lrp6 is required for convergent extension during Xenopus gastrulation." *Development* **134**(22): 4095-106.
- Takemaru, K. I. et Moon, R. T. (2000). "The transcriptional coactivator CBP interacts with beta-catenin to activate gene expression." *J Cell Biol* **149**(2): 249-54.
- Takeshita, S., Pu, L. Q., et al. (1994). "Intramuscular administration of vascular endothelial growth factor induces dose-dependent collateral artery augmentation in a rabbit model of chronic limb ischemia." *Circulation* **90**(5 Pt 2): II228-34.
- Tamai, K., Semenov, M., et al. (2000). "LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction." *Nature* **407**(6803): 530-5.
- Tamai, K., Zeng, X., et al. (2004). "A mechanism for Wnt coreceptor activation." *Mol Cell* **13**(1): 149-56.

- Tammela, T., Zarkada, G., et al. (2008). "Blocking VEGFR-3 suppresses angiogenic sprouting and vascular network formation." *Nature* **454**(7204): 656-60.
- Tan, C., Costello, P., et al. (2001). "Inhibition of integrin linked kinase (ILK) suppresses beta-catenin-Lef/Tcf-dependent transcription and expression of the E-cadherin repressor, snail, in APC^{-/-} human colon carcinoma cells." *Oncogene* **20**(1): 133-40.
- Tan, C., Dearnorff, M. A., et al. (2001). "Kermit, a frizzled interacting protein, regulates frizzled 3 signaling in neural crest development." *Development* **128**(19): 3665-74.
- Tang, Y., Liu, Z., et al. (2008). "Smad7 stabilizes beta-catenin binding to E-cadherin complex and promotes cell-cell adhesion." *J Biol Chem* **283**(35): 23956-63.
- ten Dijke, P. et Arthur, H. M. (2007). "Extracellular control of TGFbeta signalling in vascular development and disease." *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(11): 857-69.
- Tetsu, O. et McCormick, F. (1999). "Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells." *Nature* **398**(6726): 422-6.
- Thorpe, C. J., Schlesinger, A., et al. (2000). "Wnt signalling in *Caenorhabditis elegans*: regulating repressors and polarizing the cytoskeleton." *Trends Cell Biol* **10**(1): 10-7.
- Thurston, G., Rudge, J. S., et al. (2000). "Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage." *Nat Med* **6**(4): 460-3.
- Tigges, U., Hyer, E. G., et al. (2008). "FGF2-dependent neovascularization of subcutaneous Matrigel plugs is initiated by bone marrow-derived pericytes and macrophages." *Development* **135**(3): 523-32.
- Tillmanns, J., Rota, M., et al. (2008). "Formation of large coronary arteries by cardiac progenitor cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(5): 1668-73.
- Tolwinski, N. S. et Wieschaus, E. (2004). "Rethinking WNT signaling." *Trends Genet* **20**(4): 177-81.
- Toma, C., Pittenger, M. F., et al. (2002). "Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart." *Circulation* **105**(1): 93-8.
- Tondevoid, E., Eriksen, J., et al. (1979). "Observations on long bone medullary pressures in relation to arterial PO₂, PCO₂ and pH in the anaesthetized dog." *Acta Orthop Scand* **50**(6 Pt 1): 645-51.
- Toomes, C., Bottomley, H. M., et al. (2004). "Mutations in LRP5 or FZD4 underlie the common familial exudative vitreoretinopathy locus on chromosome 11q." *Am J Hum Genet* **74**(4): 721-30.
- Torban, E., Kor, C., et al. (2004). "Van Gogh-like2 (Strabismus) and its role in planar cell polarity and convergent extension in vertebrates." *Trends Genet* **20**(11): 570-7.
- Torban, E., Wang, H. J., et al. (2004). "Independent mutations in mouse Vangl2 that cause neural tube defects in looptail mice impair interaction with members of the Dishevelled family." *J Biol Chem* **279**(50): 52703-13.
- Torres, M. A. et Nelson, W. J. (2000). "Colocalization and redistribution of dishevelled and actin during Wnt-induced mesenchymal morphogenesis." *J Cell Biol* **149**(7): 1433-42.
- Tortora, G. et Ciardiello, F. (2002). "Protein kinase A as target for novel integrated strategies of cancer therapy." *Ann N Y Acad Sci* **968**: 139-47.
- Tree, D. R., Shulman, J. M., et al. (2002). "Prickle mediates feedback amplification to generate asymmetric planar cell polarity signaling." *Cell* **109**(3): 371-81.
- Trimarchi, J. M. et Lees, J. A. (2002). "Sibling rivalry in the E2F family." *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(1): 11-20.
- Tsunoda, S., Nakamura, T., et al. (2007). "Fibroblast growth factor-2-induced host stroma reaction during initial tumor growth promotes progression of mouse melanoma via vascular endothelial growth factor A-dependent neovascularization." *Cancer Sci* **98**(4): 541-8.

- Umbhauer, M., Djiane, A., et al. (2000). "The C-terminal cytoplasmic Lys-thr-X-X-X-Trp motif in frizzled receptors mediates Wnt/beta-catenin signalling." *Embo J* **19**(18): 4944-54.
- Uren, A., Reichsman, F., et al. (2000). "Secreted frizzled-related protein-1 binds directly to Wingless and is a biphasic modulator of Wnt signaling." *J Biol Chem* **275**(6): 4374-82.
- Valdimarsdottir, G., Goumans, M. J., et al. (2002). "Stimulation of Id1 expression by bone morphogenetic protein is sufficient and necessary for bone morphogenetic protein-induced activation of endothelial cells." *Circulation* **106**(17): 2263-70.
- Valiente, M., Andres-Pons, A., et al. (2005). "Binding of PTEN to specific PDZ domains contributes to PTEN protein stability and phosphorylation by microtubule-associated serine/threonine kinases." *J Biol Chem* **280**(32): 28936-43.
- van Amerongen, R. et Berns, A. (2006). "Knockout mouse models to study Wnt signal transduction." *Trends Genet* **22**(12): 678-89.
- van de Wetering, M., Cavallo, R., et al. (1997). "Armadillo coactivates transcription driven by the product of the Drosophila segment polarity gene dTCF." *Cell* **88**(6): 789-99.
- van de Wetering, M., Sancho, E., et al. (2002). "The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells." *Cell* **111**(2): 241-50.
- van der Horst, E. H., Frank, B. T., et al. (2008). "The growth factor Midkine antagonizes VEGF signaling in vitro and in vivo." *Neoplasia* **10**(4): 340-7.
- van Gijn, M. E., Blankesteyn, W. M., et al. (2001). "Frizzled 2 is transiently expressed in neural crest-containing areas during development of the heart and great arteries in the mouse." *Anat Embryol (Berl)* **203**(3): 185-92.
- van Leeuwen, F., Samos, C. H., et al. (1994). "Biological activity of soluble wingless protein in cultured Drosophila imaginal disc cells." *Nature* **368**(6469): 342-4.
- Veeman, M. T., Axelrod, J. D., et al. (2003). "A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling." *Dev Cell* **5**(3): 367-77.
- Verrecchia, F. et Mauviel, A. (2002). "Transforming growth factor-beta signaling through the Smad pathway: role in extracellular matrix gene expression and regulation." *J Invest Dermatol* **118**(2): 211-5.
- Vinals, F. et Pouyssegur, J. (2001). "Transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) promotes endothelial cell survival during in vitro angiogenesis via an autocrine mechanism implicating TGF-alpha signaling." *Mol Cell Biol* **21**(21): 7218-30.
- Vinson, C. R. et Adler, P. N. (1987). "Directional non-cell autonomy and the transmission of polarity information by the frizzled gene of Drosophila." *Nature* **329**(6139): 549-51.
- Visse, R. et Nagase, H. (2003). "Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry." *Circ Res* **92**(8): 827-39.
- Vitorino, P. et Meyer, T. (2008). "Modular control of endothelial sheet migration." *Genes Dev* **22**(23): 3268-81.
- Vlad, A., Rohrs, S., et al. (2008). "The first five years of the Wnt targetome." *Cell Signal* **20**(5): 795-802.
- Vlodavsky, I., Bar-Shavit, R., et al. (1991). "Extracellular sequestration and release of fibroblast growth factor: a regulatory mechanism?" *Trends Biochem Sci* **16**(7): 268-71.
- von Kries, J. P., Winbeck, G., et al. (2000). "Hot spots in beta-catenin for interactions with LEF-1, conductin and APC." *Nat Struct Biol* **7**(9): 800-7.
- Wallingford, J. B., Fraser, S. E., et al. (2002). "Convergent extension: the molecular control of polarized cell movement during embryonic development." *Dev Cell* **2**(6): 695-706.

- Wallingford, J. B. et Habas, R. (2005). "The developmental biology of Dishevelled: an enigmatic protein governing cell fate and cell polarity." Development **132**(20): 4421-36.
- Wallingford, J. B., Rowling, B. A., et al. (2000). "Dishevelled controls cell polarity during *Xenopus* gastrulation." Nature **405**(6782): 81-5.
- Wang, D., Lee, H. J., et al. (2006). "Coexpression of MAST205 inhibits the activity of Na⁺/H⁺ exchanger NHE3." Am J Physiol Renal Physiol **290**(2): F428-37.
- Wang, H. U., Chen, Z. F., et al. (1998). "Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4." Cell **93**(5): 741-53.
- Wang, J., Hamblet, N. S., et al. (2006). "Dishevelled genes mediate a conserved mammalian PCP pathway to regulate convergent extension during neurulation." Development **133**(9): 1767-78.
- Wang, S., Krinks, M., et al. (1997). "Frzb-1, an antagonist of Wnt-1 and Wnt-8, does not block signaling by Wnts -3A, -5A, or -11." Biochem Biophys Res Commun **236**(2): 502-4.
- Wang, Y., Guo, N., et al. (2006). "The role of Frizzled3 and Frizzled6 in neural tube closure and in the planar polarity of inner-ear sensory hair cells." J Neurosci **26**(8): 2147-56.
- Wang, Y., Huso, D., et al. (2001). "Progressive cerebellar, auditory, and esophageal dysfunction caused by targeted disruption of the frizzled-4 gene." J Neurosci **21**(13): 4761-71.
- Wang, Y., Huso, D. L., et al. (2005). "Outgrowth of a transformed cell population derived from normal human BM mesenchymal stem cell culture." Cytotherapy **7**(6): 509-19.
- Wang, Y., Macke, J. P., et al. (1996). "A large family of putative transmembrane receptors homologous to the product of the *Drosophila* tissue polarity gene frizzled." J Biol Chem **271**(8): 4468-76.
- Wang, Y. et Nathans, J. (2007). "Tissue/planar cell polarity in vertebrates: new insights and new questions." Development **134**(4): 647-58.
- Wang, Z., Shu, W., et al. (2005). "Wnt7b activates canonical signaling in epithelial and vascular smooth muscle cells through interactions with Fzd1, Fzd10, and LRP5." Mol Cell Biol **25**(12): 5022-30.
- Ware, J. A. et Simons, M. (1997). "Angiogenesis in ischemic heart disease." Nat Med **3**(2): 158-64.
- Weaver, C., Farr, G. H., 3rd, et al. (2003). "GBP binds kinesin light chain and translocates during cortical rotation in *Xenopus* eggs." Development **130**(22): 5425-36.
- Wehrli, M., Dougan, S. T., et al. (2000). "arrow encodes an LDL-receptor-related protein essential for Wingless signalling." Nature **407**(6803): 527-30.
- Wei, Q., Yokota, C., et al. (2007). "R-spondin1 is a high affinity ligand for LRP6 and induces LRP6 phosphorylation and beta-catenin signaling." J Biol Chem **282**(21): 15903-11.
- Weinstein, M., Xu, X., et al. (1998). "FGFR-3 and FGFR-4 function cooperatively to direct alveogenesis in the murine lung." Development **125**(18): 3615-23.
- Weiser, D. C., Pyati, U. J., et al. (2007). "Gravin regulates mesodermal cell behavior changes required for axis elongation during zebrafish gastrulation." Genes Dev **21**(12): 1559-71.
- Wilkinson, D. G. (2000). "Eph receptors and ephrins: regulators of guidance and assembly." Int Rev Cytol **196**: 177-244.
- Willert, K., Brink, M., et al. (1997). "Casein kinase 2 associates with and phosphorylates dishevelled." Embo J **16**(11): 3089-96.
- Willert, K., Brown, J. D., et al. (2003). "Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors." Nature **423**(6938): 448-52.

- Willert, K., Shibamoto, S., et al. (1999). "Wnt-induced dephosphorylation of axin releases beta-catenin from the axin complex." *Genes Dev* **13**(14): 1768-73.
- Williams, C. K., Segarra, M., et al. (2008). "Regulation of CXCR4 by the Notch ligand delta-like 4 in endothelial cells." *Cancer Res* **68**(6): 1889-95.
- Winklbauer, R., Medina, A., et al. (2001). "Frizzled-7 signalling controls tissue separation during *Xenopus* gastrulation." *Nature* **413**(6858): 856-60.
- Winter, C. G., Wang, B., et al. (2001). "Drosophila Rho-associated kinase (Drok) links Frizzled-mediated planar cell polarity signaling to the actin cytoskeleton." *Cell* **105**(1): 81-91.
- Wodarz, A. et Nusse, R. (1998). "Mechanisms of Wnt signaling in development." *Annu Rev Cell Dev Biol* **14**: 59-88.
- Wolff, T. et Rubin, G. M. (1998). "Strabismus, a novel gene that regulates tissue polarity and cell fate decisions in *Drosophila*." *Development* **125**(6): 1149-59.
- Wong, H. C., Bourdelas, A., et al. (2003). "Direct binding of the PDZ domain of Dishevelled to a conserved internal sequence in the C-terminal region of Frizzled." *Mol Cell* **12**(5): 1251-60.
- Wright, M., Aikawa, M., et al. (1999). "Identification of a Wnt-responsive signal transduction pathway in primary endothelial cells." *Biochem Biophys Res Commun* **263**(2): 384-8.
- Wu, L., Timmers, C., et al. (2001). "The E2F1-3 transcription factors are essential for cellular proliferation." *Nature* **414**(6862): 457-62.
- Wu, M. Y. et Hill, C. S. (2009). "Tgf-beta superfamily signaling in embryonic development and homeostasis." *Dev Cell* **16**(3): 329-43.
- Wu, W. B., Peng, H. C., et al. (2003). "Disintegrin causes proteolysis of beta-catenin and apoptosis of endothelial cells. Involvement of cell-cell and cell-ECM interactions in regulating cell viability." *Exp Cell Res* **286**(1): 115-27.
- Xu, G., Livingston, D. M., et al. (1995). "Multiple members of the E2F transcription factor family are the products of oncogenes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(5): 1357-61.
- Xu, Q., D'Amore, P. A., et al. (1998). "Functional and biochemical interactions of Wnts with FrzA, a secreted Wnt antagonist." *Development* **125**(23): 4767-76.
- Xu, Q., Wang, Y., et al. (2004). "Vascular development in the retina and inner ear: control by Norrin and Frizzled-4, a high-affinity ligand-receptor pair." *Cell* **116**(6): 883-95.
- Xu, X., Weinstein, M., et al. (1998). "Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)-mediated reciprocal regulation loop between FGF8 and FGF10 is essential for limb induction." *Development* **125**(4): 753-65.
- Yamamoto, H., Kishida, S., et al. (1999). "Phosphorylation of axin, a Wnt signal negative regulator, by glycogen synthase kinase-3beta regulates its stability." *J Biol Chem* **274**(16): 10681-4.
- Yamasaki, L., Bronson, R., et al. (1998). "Loss of E2F-1 reduces tumorigenesis and extends the lifespan of Rb1(+/-)mice." *Nat Genet* **18**(4): 360-4.
- Yanagisawa-Miwa, A., Uchida, Y., et al. (1992). "Salvage of infarcted myocardium by angiogenic action of basic fibroblast growth factor." *Science* **257**(5075): 1401-3.
- Yang-Snyder, J., Miller, J. R., et al. (1996). "A frizzled homolog functions in a vertebrate Wnt signaling pathway." *Curr Biol* **6**(10): 1302-6.
- Yang, E. Y. et Moses, H. L. (1990). "Transforming growth factor beta 1-induced changes in cell migration, proliferation, and angiogenesis in the chicken chorioallantoic membrane." *J Cell Biol* **111**(2): 731-41.
- Yang, Y., Lijam, N., et al. (1996). "Genomic organization of mouse Dishevelled genes." *Gene* **180**(1-2): 121-3.

- Yano, H., Hara, A., et al. (2000). "Immunohistochemical analysis of beta-catenin in N-ethyl-N-nitrosourea-induced rat gliomas: implications in regulation of angiogenesis." Neurol Res **22**(5): 527-32.
- Yano, H., Hara, A., et al. (2000). "Differential expression of beta-catenin in human glioblastoma multiforme and normal brain tissue." Neurol Res **22**(7): 650-6.
- Yokoyama, N., Yin, D., et al. (2007). "Abundance, complexation, and trafficking of Wnt/beta-catenin signaling elements in response to Wnt3a." J Mol Signal **2**: 11.
- Yoon, Y. S., Park, J. S., et al. (2004). "Unexpected severe calcification after transplantation of bone marrow cells in acute myocardial infarction." Circulation **109**(25): 3154-7.
- Young, H. E., Duplax, C., et al. (2004). "Clonogenic analysis reveals reserve stem cells in postnatal mammals. II. Pluripotent epiblastic-like stem cells." Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol **277**(1): 178-203.
- Yu, A., Rual, J. F., et al. (2007). "Association of Dishevelled with the clathrin AP-2 adaptor is required for Frizzled endocytosis and planar cell polarity signaling." Dev Cell **12**(1): 129-41.
- Zallen, J. A. (2007). "Planar polarity and tissue morphogenesis." Cell **129**(6): 1051-63.
- Zeng, X., Tamai, K., et al. (2005). "A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation." Nature **438**(7069): 873-7.
- Zerlin, M., Julius, M. A., et al. (2008). "Wnt/Frizzled signaling in angiogenesis." Angiogenesis **11**(1): 63-9.
- Zhang, X., Gaspard, J. P., et al. (2001). "Regulation of vascular endothelial growth factor by the Wnt and K-ras pathways in colonic neoplasia." Cancer Res **61**(16): 6050-4.
- Zheng, L., Zhang, J., et al. (1995). "frizzled regulates mirror-symmetric pattern formation in the Drosophila eye." Development **121**(9): 3045-55.
- Zhou, F., Zhang, L., et al. (2008). "LEF-1 activates the transcription of E2F1." Biochem Biophys Res Commun **365**(1): 149-53.
- Zhu, J., Motejlek, K., et al. (2002). "beta8 integrins are required for vascular morphogenesis in mouse embryos." Development **129**(12): 2891-903.
- Zorn, A. M., Barish, G. D., et al. (1999). "Regulation of Wnt signaling by Sox proteins: XSox17 alpha/beta and XSox3 physically interact with beta-catenin." Mol Cell **4**(4): 487-98.

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

I. COMMUNICATIONS

1- “Hypoxia induces mesenchymal stem cell proliferation independently of the wnt β -catenin canonical pathway”

Descamps B., Leroux L., Dufourcq P., Moreau C. Ivanovic Z., Couffinhal T. Duplâa C.

- . Poster, congrès du GRRC, Tours, Avril 2007
- . **Prix poster**, EVGN summer school, Suède, Août 2007
- . **Communication orale** et poster, congrès de l’EVGN, Bristol, Septembre 2007
- . **Concours jeunes chercheurs, 4 me**, Journées européennes de la société française de cardiologie, Paris, Janvier 2008

2- “Frizzled 4 decreases 3T3 cell proliferation and migration, and participates to the regulation of the Wnt/frizzled canonical signalling pathway through dishevelled 1 and 3”

Descamps B., Dufourcq P., Moreau C., Vinassa B., Couffinhal T., Duplâa C.

- . **Communication orale** et poster, congrès du GRRC, Montpellier, Mai 2009

3- “Hypoxic priming of mesenchymal stem cells enhances their reparative and angiogenic properties in murin model of hindlimb ischemia”

Leroux L., Descamps B., Oses P., Dufourcq P., Daniel Lamazière JM., Moreau C., Ivanovic Z., Couffinhal T., Duplâa C.

- . Poster, congrès du GRRC, Montpellier, Mai 2009

4- “Frizzled 4 regulates vascular formation in mice”

Descamps B., Ferreira Tojais N., Oses P., Moreau C., Daniel Lamazière JM., Dufourcq P., Couffinhal T., Duplâa C.

- . **Communication orale** et poster, congrès du GRRC, Nancy, Avril 2009

5- “Frizzled 4, a new molecular player, during vessel formation and arterial branching morphogenesis in mice”

Descamps B., Tojais N.F, Oses P, Chauvel R, Seguy B, Moreau C, Daret D, Dufourcq P, Daniel Lamazière JM, Couffinhal T, Duplâa C.

- . Poster, congrès de l’EMVBM, Marseille, Septembre 2009

6- “First evidences of Frizzled-7 involvement in vessel formation”

Ferreira Tojais N., Descamps B., Mione M., Moreau C., Daniel Lamazière JM., Couffinhal T., Duplâa C., Dufourcq P.

. Poster, congrès du GRRC, Nancy, Avril 2009

. Poster, congrès de l’EMVBM, Marseille, Septembre 2009

GRRC : Groupe de réflexion sur la recherche cardiovasculaire

EVGN : European vascular genomics network

EMVBM : European meeting on vascular biology and medicine

II. PUBLICATIONS

1- “Regulation of endothelial cell cytoskeletal reorganisation by a secreted Frizzled-related protein-1 and Frizzled 4- and Frizzled 7-dependent pathway”

Dufourcq P, Leroux L, Ezan J, Descamps B, Lamazière J. M, Costet P, Basoni C, Moreau C, Deutsch U, Couffinhal T, Duplâa C. **Am J Pathol.** 2008 Jan; 172(1):37-49

2- “Secreted Frizzled-related protein-1 enhances mesenchymal stem cell function in angiogenesis and contributes to neovessel maturation”

Dufourcq P, Descamps B, Tojais N. F., Leroux L, Osés P., Daret D, Moreau C, Daniel Lamazière JM, Couffinhal T, Duplâa C. **Stem Cells** 2008 Dec, 26, 2991-3001

3- “Mesenchymal stem cells preconditionned by hypoxia improve vascular and skeletal myoblast regeneration after ischemia through a Wnt4 dependent pathway”

Leroux L, Descamps B, Tojais N. F, Osés P, Moreau C, Daret D, Ivanovic Z, Boiron JM, Daniel Lamazière JM, Dufourcq P, Couffinhal T, Duplâa C. **Soumis.**

Etude des propriétés angiogéniques du système Wnt/Frizzled – Implication du récepteur Frizzled4 dans la morphogenèse artérielle

De plus en plus d'études impliquent la signalisation Wnt/Frizzled (Wnt/Fzd) dans la formation des vaisseaux. La première partie de ce manuscrit démontre d'ailleurs que la signalisation Wnt, via son régulateur sFRP1 et un de ses ligands, Wnt4, potentialise les effets angiogéniques des cellules souches mésenchymateuses lors de l'angiogénèse.

Le récepteur Frizzled4 (Fzd4), lui, est impliqué dans le développement vasculaire de la rétine puisque la délétion du gène *fzd4* révèle une malformation du réseau vasculaire rétinien secondaire et tertiaire. Le but de ce travail a été d'étudier l'implication de Fzd4 dans la régulation de la morphogenèse vasculaire chez l'adulte.

Il s'avère que Fzd4 présente un profil d'expression plutôt artériel, et que la délétion de ce gène empêche la formation d'un réseau artériel normal des organes périphériques. Des études *in vitro* réalisées sur des cellules vasculaires primaires ont mis en évidence plusieurs altérations de leurs propriétés angiogéniques. Cette étude a donc démontré un rôle central de Fzd4 dans la croissance vasculaire. Fzd4 régule les propriétés des cellules vasculaires mises en jeu dans l'angiogénèse, et régule la morphogenèse des ramifications vasculaires *in vivo*.

Pour identifier et comprendre les mécanismes moléculaires induits par le récepteur Fzd4, une étude sur la protéine centrale du système Wnt/Fzd, l'isoforme Dishevelled (Dvl), et sur ses partenaires intracellulaires, a été initiée. Les premiers résultats suggèrent que les isoformes 1 et 3 de Dvl participent via Fzd4 à l'activation de la voie canonique nécessaire à la prolifération cellulaire. De plus, certains partenaires intracellulaires de Dvl3 ont pu être sélectionnés par une méthode de double hybride réalisée chez la levure.

Study of Wnt/Frizzled angiogenic properties - Implication of Frizzled4 receptor in arterial morphogenesis

Growing evidences link Wnt/Frizzled (Wnt/Fzd) pathway to proper vascular formation. The first part of this manuscript shows besides that Wnt pathway, via its regulator sFRP1 and one of its ligands, Wnt4, potentiates mesenchymal stem cells angiogenic properties during angiogenesis.

An other Frizzled receptor (Fzd), Fzd4, has been shown to be implicated in retinal vascular formation because inactivation of the *fzd4* gene revealed a malformation of the secondary and tertiary retinal vascular network. Here, we investigated the involvement of Fzd4 in adult vascular morphogenesis regulation.

Fzd4 present an arterial vascular pattern, and the deletion of *fzd4* impairs a normal arterial network formation in peripheral organs. *In vitro* studies on primary vascular cells show several alterations on their angiogenic properties. This study reveals a central role of Fzd4 in vascular growth. Fzd4 regulate angiogenic vascular cell properties and vascular branching morphogenesis *in vivo*.

To further understand molecular mechanisms induced by Fzd4, we started to study the Wnt/Fzd central protein, Dishevelled (Dvl), and its intracellular partners. First results suggest that Dvl 1 and 3 isoforms would participate with Fzd4 to activate Wnt canonical pathway implicated in cell proliferation. Moreover, some Dvl3 partners could be selected by a yeast two-hybrid method.

Mots-clés : Frizzled 4, réseau artériel, ramifications vasculaires, cellules vasculaires, propriétés angiogéniques
